

pic60

**ÉTUDE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE
DE L'HORMONE GONADOTROPE
D'UN POISSON TÉLÉOSTÉEN, LA CARPE
(*CYPRINUS carpio* L.)**

par

Élisabeth BURZAWA-GÉRARD

SOMMAIRE

	Pages
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
MATERIEL ET METHODES	9
I. — Matériel de départ	9
II. — Méthodes biochimiques	9
A. — Méthodes préparatives	9
1. — Percolation alcoolique	9
2. — Chromatographie et filtration sur gel	9
3. — Solubilisation fractionnée par le sulfate d'ammonium	10
4. — Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide	10
B. — Méthodes de dosages chimiques	10
1. — Détermination des acides aminés	10
2. — Détermination des glucides	10
C. — Méthodes analytiques	10
1. — Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide	10
2. — Ultracentrifugation	10
III. — Méthodes immunologiques	11
IV. — Méthodes biologiques	11
A. — Dosage de l'activité gonadotrope sur des Vertébrés inférieurs	11
1. — L'Anguille	11
2. — Le Cyprin	11
3. — La Grenouille	12
4. — Le Têtard	13



B. — Dosage de l'activité gonadotrope sur le Rat	14
1. — Détermination de l'activité folliculostimulante	14
2. — Détermination de l'activité lutéinisante	14
C. — Dosage de l'hormone thyroïdienne	14
V. — Préparations des solutions hormonales	14
A. — Extraits hypophysaires	14
B. — Produits purifiés	14
VI. — Méthodes statistiques	14
VII. — Standard	15

CHAPITRE I. — PURIFICATION ET CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DE L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE - COMPARAISON AVEC LES HORMONES GONADOTROPES (LH ET FSH) DES MAMMIFÈRES	17
I. — Introduction	17
II. — Préparation	17
A. — Matériel de départ	17
B. — Test biologique	18
C. — Protocole expérimental de la purification	19
1. — Percolation alcoolique	19
2. — Chromatographie sur échangeurs d'ions	19
a) CMC	19
b) DEAEAC	19
3. — Essai de fractionnement par solubilisation fractionnée après précipitation au sulfate d'ammonium	23
4. — Filtration sur Sephadex G 100	24
5. — Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide	25
6. — Résumé	26
III. — Etude de l'état d'homogénéité	27
A. — Filtration sur Sephadex G 100	27
B. — Ultracentrifugation dans un gradient de saccharose	27
C. — Electrophorèse analytique	29
D. — Essai immunologique	32
1. — Immuno-electrophorèse	32
2. — Test radio-immunologique	32
E. — Résumé	32
IV. — Caractéristiques biochimiques	32
A. — Composition chimique	32
1. — Composition en acides aminés	32
2. — Composition en glucides	32
B. — Constantes physico-chimiques	33
1. — Poids moléculaire	33
2. — Point isoélectrique	35

C. — Structure quaternaire	35
1. — Action de l'urée	35
a) Sur l'activité biologique	35
b) Sur l'encombrement moléculaire	35
2. — Effet du changement de pH	37
a) Sur l'activité biologique	37
b) Sur l'encombrement moléculaire	37
3. — Action de l'acide propionique M	39
a) Sur l'activité biologique	39
b) Sur l'encombrement moléculaire	39
4. — Essai de réassociation	39
5. — Propriétés de la fraction (A) obtenue après électrophorèse préparative	40
D. — Résumé	42
V. — Comparaison biochimique entre les hormones gonadotropes LH et FSH de Mammifères et l'hormone gonadotrope de Carpe	42
A. — Composition chimique	42
1. — Acides aminés	42
2. — Glucides	44
B. — Constantes physico-chimiques	44
C. — Effets des agents dissociants	45
D. — Conclusion	45
VI. — Discussion	45
A. — Préparation	45
B. — Degré de pureté et structure quaternaire	46
C. — Comparaison avec les hormones LH et FSH des Mammifères	47
CHAPITRE II. — CARACTERISATION BIOLOGIQUE DE L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE - COMPARAISON AVEC LES HORMONES GONADOTROPES DES MAMMIFERES	48
I. — Introduction	48
II. — Action de la c-GTH sur la gonade de Poissons Téléostéens : nature hormonale de c-GTH	48
A. — Régénération de la gonade du Cyprin hypophysectomisé	49
1. — Résultats obtenus sur la gonade mâle	49
2. — Résultats obtenus sur la gonade femelle	49
B. — Action de la c-GTH sur divers paramètres biochimiques de l'activité gonadique	52
1. — Chez l'Anguille	52
2. — Chez le Cyprin	52
C. — Discussion et résumé	52
III. — Etude du rapport d'activité $\frac{c-GTH}{\text{Hypophyse de Carpe}}$: unicité de l'hormone gonadotrope de la Carpe	55
A. — Résultats	55

B. - Discussion	56
C. - Résumé et conclusion	56
IV. - Comparaison sur différents receveurs de l'activité biologique de l'hormone gonadotrope de la Carpe avec celles des LH et FSH des Mammifères	56
A. - Recherches de l'activité biologique des hormones gonadotropes des Mammifères sur les Vertébrés inférieurs	56
1. - Anguille	59
a) LH	59
b) FSH	59
2. - Cyprin	59
a) Régénération de la gonade de Cyprin hypophysectomisé	59
b) Mesure de l'activité adényl-cyclasique de l'ovaire en prévitellogénèse	59
3. - Amphibiens	59
B. - Recherche de l'activité biologique de l'hormone gonadotrope de la Carpe sur le Rat	60
1. - Déplétion de l'acide ascorbique de l'ovaire chez la Ratte pseudogestante	60
2. - Augmentation de poids de l'ovaire de la Ratte prépubère traité par HCG	60
V. - Discussion	62
A. - Nature hormonale	62
B. - Nombre des hormones	63
C. - Spécificité zoologique	66
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	69
BIBLIOGRAPHIE	71

ABREVIATIONS

LH	hormone lutéinisante
o-LH	hormone lutéinisante ovine (L'initiale du nom latin du genre de l'animal précédera le sigle désignant l'hormone lorsque nous souhaiterons préciser l'origine zoologique de la préparation hormonale.)
b-LH	hormone lutéinisante bovine
FSH	hormone folliculo-stimulante
o-FSH	hormone folliculo-stimulante ovine
GTH	hormone gonado-stimulante
c-GTH	hormone gonadostimulante de Carpe
onc-GTH	hormone gonadostimulante d'Oncorhynchus
HCG	hormone chorionique humaine
PMSG	gonadotropine de sérum de Jument gravide
TSH	hormone thyroïdienne
ACTH	hormone corticotrope
AMP, ATP	mono ou triphosphate d'adénosine
AMP _c	3' 5' monophosphate cyclique d'adénosine
RCS	rapport gonado-somatique
DEAEC	diéthylaminoéthylcellulose
CMC	carboxyméthylcellulose
TS	taux de sédimentation
A.A.	acide aminé

INTRODUCTION

L'hypophyse des Poissons Téléostéens comme celle des Mammifères exerce une action décisive dans la stimulation des gonades : l'hypophysectomie entraîne, dans la majeure partie des cas observés, l'atrophie des glandes génitales et la disparition des caractères sexuels secondaires (cf. PICKFORD et ATZ, 1957).

Quand nous avons commencé nos recherches, seules les hormones des Mammifères avaient été purifiées. FEVOLD et al. (1931) furent les premiers à obtenir, à partir d'un extrait hypophysaire, deux fractions, l'une agissant essentiellement sur le développement des follicules ovariens et la spermatogénèse chez le Rat et qu'ils appelèrent « Follicle stimulating hormone » (FSH), et l'autre responsable de la transformation des follicules en corps jaunes chez la femelle et stimulant la sécrétion des androgènes dans le tissu interstitiel chez le mâle. Cette dernière hormone fut appelée « Luteinizing Hormone » (LH). VAN DYKE et WALLER LAURENCE (1932) et EVANS et al. (1936) confirmèrent ces observations en isolant à partir de l'hypophyse deux fractions gonatotropes possédant des propriétés biologiques différentes.

Deux hormones gonatotropes de ce type ont-elles été mises en évidence chez les Poissons Téléostéens ?

VIVIEN (1939-1941-1952), KAZANSKII (1951) en particulier, ont abordé cette question en étudiant tout d'abord l'action d'hypophyse de Poisson (greffes ou injections d'extraits) sur des Poissons hypophysectomisés. Ils obtiennent une stimulation de la gonade, stimulation qui est la plus importante lorsque les extraits hypophysaires proviennent, d'une part d'animaux en période de fraie, et d'autre part d'espèces voisines de celle du poisson receveur. Ces expériences, étant réalisées avec des extraits bruts, ne permettent pas de savoir si les effets observés sont le fait d'une ou plusieurs substances actives (BUTLER, 1940).

Un autre type d'expérience a consisté à étudier chez les Poissons l'action des préparations purifiées de LH et FSH des Mammifères (cf. PICKFORD et ATZ, 1957 et HOAR, 1969). Les préparations de FSH conduisent le plus souvent à des résultats négatifs. Les préparations de LH au contraire produisent généralement une action sur la gamétogénèse et la stéroïdogénèse. PICKFORD (données citées dans PICKFORD et ATZ, 1957) obtient une augmentation du rapport gonadosomatique avec la LH sur *Fundulus heteroclitus* hypophysectomisé. SUNDARARAJ et GOSWAMI (1966 a) stimulent l'ovulation avec la LH chez *Heteropneustes fossilis*. Les travaux d'ASHAN (1966) et de YAMAZAKI (1965) confirment ces résultats. Cependant, HASLER et MEYER (1942) n'observent aucune action de la LH chez le Cyprin et sur ce même Poisson hypophysectomisé. YAMAZAKI et DONALDSON (1968 a) n'incluent pas la spermiation après l'injection de LH et FSH alors que des réponses positives sont observées avec des préparations d'hormone chorionique humaine. La maturation de l'Anguille mâle (FONTAINE M., 1936) mais non celle des femelles (FONTAINE M., 1939. BRIJUN et al., 1941) a été obtenue par injection de prolans. Toutefois, l'Anguille femelle mûrit après un traitement par les extraits hypophysaires de Carpe (FONTAINE M. et al. 1964).

Ces résultats indiquent que certains paramètres de l'activité des gonades de Poissons peuvent (directement ou non), être stimulés par les hormones gonadotropes des Mammifères mais ceci ne prouve pas que l'hypophyse des Poissons sécrète des substances respectivement similaires à la LH et à la FSH. En fait, bien que la possibilité de l'existence chez les Poissons d'une seule hormone gonadotrope ait été envisagée par BUTLER (1940), la plupart des auteurs supposaient jusqu'à ces dernières années que deux substances hormonales, respectivement de type LH et FSH, étaient présentes dans l'hypophyse des Téléostéens.

De plus, les études que nous venons de résumer succinctement posent un second problème : celui de la spécificité zoologique des hormones gonadotropes. HOUSSAY et al. (1929) furent les premiers à suggérer l'existence d'une spécificité zoologique. De nombreux auteurs et en particulier CREASER et CORBMAN (1939) étayèrent cette conception sur la base d'expériences croisées réalisées avec des extraits bruts d'hypophyses de divers Poissons, mais la présence d'inhibiteurs dans ces préparations impures pourrait aussi expliquer les résultats obtenus. Toutefois l'existence d'une réelle spécificité zoologique a été démontrée dans le cas de la TSH (Y.-A. FONTAINE, 1969). Or la TSH est, comme les hormones gonadotropes, une glycoprotéine et de plus, on a émis l'hypothèse que les diverses glycoprotéines hypophysaires pourraient être homologues, c'est-à-dire descendre d'une même molécule ancestrale, même si elles exercent des fonctions différentes thyroïdienne ou gonadotrope (Y.-A. FONTAINE, 1969). Cette hypothèse est renforcée par les récentes données structurales obtenues par différents auteurs pour les hormones glycoprotéiques des Mammifères. Les hormones LH, FSH et TSH sont constituées par deux chaînes peptidiques α et β . Les chaînes α de ces hormones sont similaires ou identiques (cf. PIERCE, 1971 et PAPKOFF, 1971).

La purification et la recherche de la nature chimique des molécules qui possèdent l'activité gonadotrope chez les Poissons Téléostéens apparaît nécessaire afin d'une part, d'assigner à certaines entités chimiques des activités biologiques bien définies et de déterminer le nombre des hormones gonadotropes présentes dans l'hypophyse des Poissons, et d'autre part d'apporter des éléments nouveaux à l'étude de la spécificité zoologique.

Nous décrirons tout d'abord les conditions de purification d'un facteur gonadotrope présent dans l'hypophyse d'un Poisson Téléostéen, la Carpe (*Cyprinus carpio* L.), et ses caractéristiques chimiques seront étudiées. Ensuite les propriétés biologiques de ce matériel seront analysées. Nous montrerons ainsi qu'il s'agit effectivement de l'hormone gonadotrope de la Carpe. Cette hormone sera, tant du point de vue chimique que biologique, comparée aux hormones LH et FSH des Mammifères.

MATERIEL ET METHODES

I. — MATERIEL DE DEPART : HYPOPHYSE DE CARPE

La poudre d'hypophyses de Carpe a été fournie par les Stoller Fisheries (Spirit lake Iowa U.S.A.). C'est un matériel déshydraté et dégraissé par l'acétone. Les glandes proviennent d'animaux mâles et femelles, pesant de 3 à 4 kg, capturés au printemps. L'activité gonadotrope des trois poudres reçues, déterminée sur le test de spermiation de la Grenouille présente des variations qui ne sont pas statistiquement différentes (tableau I).

TABLEAU I

*Activité gonadotrope (mesurée par le test de spermiation de la Grenouille)
des lots de poudre hypophysaire de Carpe*

	Poudre I	Poudre II	Poudre III
D 50* pg/grenouille	70,7 (58,9 - 78,3) **	42,3 (29,8 - 60,1) **	50,6 (41,3 - 60,3) **
Activité *** U/mg	31,2	52,0	43,5

* Dose (exprimée en μ /grenouille) induisant 50% de réponses positives.

** Limites pour $p = 0,95$.

*** Activité gonadotrope exprimée en U/mg en terme de LH-NH-S1.

II. — METHODES BIOCHIMIQUES

A. — METHODES PRÉPARATIVES

1. — Percolation alcoolique

Cette méthode a été décrite par BATES et al. (1959) et nous l'avons appliquée à la poudre hypophysaire de Carpe. La poudre est mélangée au même poids d'hyflo-supercell dans l'éthanol 95%. Le « cake », ainsi formé, est extrait successivement par des solutions alcooliques (teneur décroissante en éthanol) saturées en NaCl (éthanol 76 %, NaCl 2 %, - éthanol 57 %, NaCl 5 %).

2. — Chromatographie et filtration sur gel

Les chromatographies sur résines échangeuses d'ions (DEAEC et CMC) ont été effectuées selon SUBER et al. (1956).

Les filtrations sur gel Sephadex (G 100 - G 50) ont été conduites selon FLODIN et KILLANDER (1962). La filtration sur Sephadex conduit généralement à une séparation en fonction du poids moléculaire. Le Sephadex G 50 a surtout été utilisé pour changer le tampon des solutions de protéines non retardées sur ce gel.

3. — Solubilisation fractionnée par le sulfate d'ammonium

Les protéines à séparer sont précipitées par le sulfate d'ammonium. La préparation repose 24 heures à 4 °C puis on ajoute 10 g d'hyflopercell et le mélange est placé dans une colonne. Un gradient de concentration décroissant en sulfate d'ammonium est ensuite appliqué.

4. — Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide

Nous avons appliqué le système préparatif développé par JOVIN et al. (1964). L'appareil Buchler est utilisé dans les conditions standard de concentration en acrylamide et de tampon (cf. fig. 9).

B. — MÉTHODES DE DOSAGES CHIMIQUES

1. — Détermination des acides aminés

Les acides aminés libérés, après hydrolyse acide (HCl 6 N à 110 °C en tube scellé sous atmosphère d'azote), sont recherchés après trois temps d'hydrolyse (24 - 48 - 72 heures) : et la concentration de chacun d'eux sera extrapolée à la valeur maximale. Le dosage est effectué par chromatographie des hydrolysats sur colonnes de résines selon la technique de MOORE et al. (1958) au moyen de l'auto-analyseur Beckman 120 B.

2. — Détermination des glucides

a) La teneur en hexoses totaux est déterminée après hydrolyse acide dans HCl 3 N pendant 4 heures à 100 °C. La méthode de dosage appliquée est celle décrite par TSUGITA et AKABORI (1959).

b) Les hexosamines ont été dosées par la méthode suivie par NEUHAUS et LETZING (1957) après hydrolyse acide (HCl 3 N) pendant 4 heures.

c) La recherche des sucres en C 5 a été conduite selon la méthode de DISCHE et SHETTLER (1948).

C. — MÉTHODES ANALYTIQUES

1. — Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide

Cette méthode est appliquée selon ORNSTEIN (1964) et dans les conditions standard de gels et de tampons décrites par DAVIS (1964). Après la migration des protéines à analyser, les gels sont placés dans une solution d'Amido Scharwz. L'excès de colorant non fixé par les protéines est éliminé par diffusion dans les bains d'acide acétique à 7 %.

Nous avons tenté de découper les gels analytiques pour localiser la position des protéines possédant l'activité biologique. Les gels après la migration dans le champ électrique sont immédiatement découpés en section de 1 mm. Les disques ainsi obtenus sont homogénéisés à l'aide d'un broyeur de type Potter dans 1 ml de NaCl à 0,1 M. L'activité biologique est recherchée dans les suspensions.

2. — Ultracentrifugation

Les ultracentrifugations en gradient de saccharose (5 à 20 %) sont réalisées selon MARTIN et AMES (1961) et Y.-A. FONTAINE et CONDLIFFE (1964). La centrifugation (Ultracentrifugeuse Spinco L/L 2) dure 15 heures à 65.000 tr. min. Des fractions de 10 gouttes (0,133 ml) sont recueillies, sauf pour les gradients réalisés en milieu propionique M où des fractions de 15 gouttes (0,129 ml) sont prélevées. Le dosage des protéines dans chaque fraction est réalisé par la méthode de LOWRY et al. (1951) au moyen de l'auto-analyseur Technicon (LACHIVER, données inédites). Dans le cas des gradients réalisés en milieu propionique M, nous avons auparavant neutralisé chaque fraction avec de la soude 0,5 N.

III. — METHODES IMMUNOLOGIQUES

Les anticorps correspondant aux protéines à étudier ont été obtenus après immunisation, par la préparation G 139, d'un Lapin albinos de race New-Zealand (fourni par M. BIVET, 17-Peyrolland) pesant de 3 à 4 kg au moment du sacrifice, selon un protocole voisin de celui décrit par UTIGER et al. (1963). Les animaux reçoivent trois injections, toutes les deux semaines d'une solution contenant 1 mg d'antigène dans 1 ml d'une solution de NaCl 0,15 M et émulsionnée dans 1 ml d'adjuvant de Freund complet (Difco Laboratories Detroit Michigan). Les antisérums sont obtenus 10 à 14 jours après la dernière injection.

L'antisérum contre la préparation BG 2-67 a été obtenu par immunisation d'un cobaye (B. BRETON et al, 1971). L'animal reçoit cinq injections de 250 µg de la préparation, additionnée de substosan retard et d'adjuvant de Freund complet, les suivantes alternativement en Freund incomplet et complet.

Les anticorps ainsi obtenus ont été étudiés par deux techniques :

— L'immuno-électrophorèse qui a été appliquée selon la méthode décrite par GRABAR (1960). Nous avons utilisé l'appareil LKB.

— L'étude du rapport $\frac{B}{F} = \frac{\text{hormone liée}}{\text{hormone libre}}$ a permis la mise au point d'un dosage radio-immunologique selon la technique décrite par BERSON et al. (1956) et BRETON et al. (1971).

IV. — METHODES BIOLOGIQUES

L'activité gonadotrope présente dans l'hypophyse de la Carpe a été étudiée sur de nombreux receveurs et tout particulièrement chez les Vertébrés inférieurs. L'activité thyroïdienne a été également déterminée dans certains cas.

A. — DOSAGE DE L'ACTIVITÉ GONADOTROPE SUR DES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

1. — *L'Anguille (Anguilla anguilla L.)*

Le test de fixation du phosphore radio-actif (sous forme de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$) par le testicule de l'Anguille a été utilisé selon la méthode de M. FONTAINE (données inédites) dans les conditions décrites précédemment (E. BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1965). Les Anguilles proviennent des étangs de Brière ou de la Somme.

2. — *Le Cyprin (Carrasius auratus L.)*

Nous avons utilisé des Poissons de 10 à 15 kg (Scapex, Paris).

a) Les tests d'hydratation du testicule (CLEMENS et GRANT, 1964) a été utilisé dans les conditions précédemment décrites (E. BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1966).

b) L'étude de la régénération de la gonade mâle ou femelle du Cyprin hypophysectomisé a été réalisé en collaboration avec R. BILLARD et B. BRETON (I.N.R.A., Jouy-en-Josas). Les Cyprins, pesant de 9 à 11 g, sont hypophysectomisés par voie operculaire selon la technique de CHAVIN (1956).

Ils sont maintenus à 20 °C sous une photopériode de 14 heures à l'aide de tubes fluorescents « blanc super » en bassins de 300 l d'eau contenant 0,2 % de NaCl et oxygénés par air comprimé.

Trente-cinq jours après l'hypophysectomie, les Poissons reçoivent par injection intra-péritonéale trois fois par semaine les solutions hormonales.

Les animaux sont sacrifiés entre 20 et 70 jours de traitement. Les gonades sont pesées et fixées dans le Bouin (Hollande). L'hypophysectomie est contrôlée par l'examen des coupes histologiques de la région correspondante du cerveau.

L'étude histologique des gonades porte sur des coupes sériées de 5 μ d'épaisseur. L'analyse quantitative de la spermatogenèse a été effectuée par M. BILLARD par comptage des différentes cellules de la lignée spermatogénétique à l'aide d'un oculaire intégrateur.

c) L'activité adénylcyclasique, dans un homogénat d'ovaire de Cyprin, a été déterminée en collaboration avec Y.-A. FONTAINE. Le principe de la méthode consiste à mesurer $^{32}\text{P}\text{-AMP}_c$ formé à partir de $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ placé dans le milieu d'incubation. Le dosage de l' AMP_c formé est réalisé selon la méthode de KRISHNA et al. (1968).

3. — La Grenouille (*Rana esculanta* L.)

Le test de spermiation de la Grenouille a été appliqué selon la technique mise au point par FONTAINE et CHALVEL (1961).

Des animaux mâles pesant de 14 à 15 g provenant de Vendée (M. BURCAUD, Saint-Hilaire-de-Riez) sont placés dans une chambre froide à 10 °C où ils sont maintenus de 8 à 15 jours. La veille du dosage, ils sont placés à 20 °C. Ils reçoivent par injection dans les sacs lymphatiques dorsaux 0,5 ml de la solution à doser : 2 heures après, on recherche au microscope la présence de spermatozoïdes dans l'urine. On utilise généralement 10 Grenouilles par dose et le résultat est exprimé en pourcentage d'animaux positifs, c'est-à-dire présentant des spermatozoïdes dans l'urine (l'absence de ceux-ci ayant été vérifiée avant l'injection).

Une régression linéaire entre le pourcentage de réponse positive, exprimé en probit, et le logarithme de la dose est obtenu (fig. 1). La dose moyenne effective peut être définie ; elle

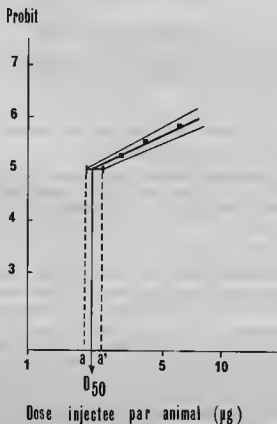


Figure 1

Test de spermiation de la grenouille - Réponse obtenue avec l'hormone de référence (LH-NIH-S1)
Définition de la dose moyenne D50 \pm déviation standard
a et a' selon Emmens (1948)

représente la dose qui, injectée aux Grenouilles, induit 50 % de réponses positives. Elle sera représentée par le symbole D50. Sa détermination permet une comparaison facile de l'activité gonadotrope présente dans différents extraits. Un deuxième mode d'expression de l'activité gonadotrope a également été utilisé : l'activité gonadotrope de la poudre hypophysaire peut être comparée à celle d'un standard hormonal. Nous avons utilisé dans ce but la LH-NH-S 1. L'activité gonadotrope est alors exprimée en unité de LH par mg de la poudre à doser. Une unité de LH est l'activité présente dans 1 mg de LH-NH-S 1. Nous avons employé également l'expression mg LH-NH mg.

Cependant, certaines précautions doivent être prises : si la D50 d'une même préparation d'hypophyses de Carpe reste sensiblement constante au cours de l'année, il n'en est pas de même avec la préparation LH-NH (fig. 2). Toutefois, le parallélisme des relations Log dose-Probite obtenues avec la LH-NH-S 1 et l'extrait hypophysaire de Carpe est vérifié (χ^2 diff. = 0,34 $p > 0,05$). Aussi une période de référence a-t-elle été choisie où la D50 pour la LH ne varie sensiblement pas. Toutes les valeurs exprimées, dans ce travail, en terme de LH-NH ont été mesurées au cours de cette période.

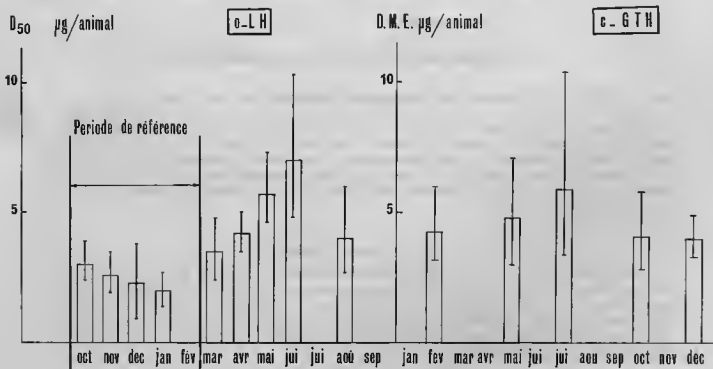


Figure 2

Variation comparée de la D50 au cours de l'année pour l'hormone de référence LH-NH-S1 et pour l'hormone gonadotrope de la Carpe.

Les limites de confiance sur D50 ($p = 0,95$) sont figurées par un segment de droite verticale.

4. — Le Têtard (*Alytes obstetricans* L.)

Le testicule du Têtard, sous l'influence d'extraits gonadotropes, présente un gonflement caractéristique (DELSOL, 1959 - DELSOL et FLATIN, 1964). Cette réaction a été utilisée pour mettre au point un dosage biologique que nous avons appliqué dans les conditions décrites par LERAY (1963). Nous remercions le Professeur DELSOL, qui nous a procuré les Têtards pour réaliser cette expérience.

B. — DOSAGE DE L'ACTIVITÉ GONADOTROPE SUR LE RAT

1. — Détermination de l'activité folliculostimulante

Le dosage de l'activité folliculostimulante a été réalisé selon la méthode de STEFMAN et POHLEY (1953).

2. — Détermination de l'activité lutéinisante

Le dosage de l'activité lutéinisante a été réalisé selon la méthode de PARLOW (1961) dans les conditions modifiées selon PELLETIER (1963), ce qui permet d'obtenir une meilleure réponse avec les Rattes de souche Wistar que nous utilisons au laboratoire.

C. — DOSAGE DE L'HORMONE THYRÉOTROPE

La détermination de l'activité thyroïdienne dans nos préparations a été réalisée sur la Truite (*Salmo gairdnerii* L.) selon la méthode décrite par M. FONTAINE et Y.-A. FONTAINE (1956) et Y.-A. FONTAINE (1969). Elle consiste à mesurer la fixation d'iode radio-actif par la thyroïde de la jeune Truite à jeun.

V. — PRÉPARATIONS DES SOLUTIONS HORMONALES

A. — EXTRAITS HYPHYSAIRES

Ils ont été obtenus par la méthode décrite par Y.-A. FONTAINE (1955). La poudre hypophysaire est successivement congelée et décongelée dans NaCl 0,1 M pour les Poissons et Amphibiens ou 0,15 M pour les Mammifères. Après centrifugation, le surnageant éventuellement dilué est injecté aux animaux. Cependant, une simple suspension de poudre acétonique broyé dans NaCl 0,1 M a été injecté aux Cyprins au cours des expériences de régénération de la lœction des gonades des Cyprins hypophysectomisés.

B. — PRODUITS PURIFIÉS

Les produits purifiés ont été dissous dans des solutions de NaCl 0,1 M ou 0,15 M selon le receveur choisi. De plus, lorsque la concentration du produit à doser devient inférieure à 5 $\mu\text{g/ml}$, nous utilisons une solution contenant une protéine étrangère inerte telle que la gélatine ou le sérum albumine bovine, afin d'éliminer les effets dénaturants d'une trop grande dilution (Y.-A. FONTAINE, 1969). Nous avons employé la solution suivante : gélatine 1 $\mu\text{g/l}$; NaCl 0,1 M ou 0,15 M ; tampon phosphate 0,02 M pH 7,0.

VI. — MÉTHODES STATISTIQUES

A. — Les données énumératives (réponses individuelles) ont été étudiées statistiquement par la détermination de la moyenne \bar{y} et de l'erreur type de la moyenne s . Le test d'homogénéité a été appliqué lorsque plusieurs moyennes y_1, y_2, y_3 ont été comparées. Les régressions $Y = \text{Log}(X)$ où X représente la dose du produit injecté par animal sont linéaires dans un certain intervalle de doses pour les différentes techniques que nous avons employées.

La linéarité a été étudiée par l'analyse de variance et le parallélisme de deux ou plusieurs régressions par analyse de covariance.

Un rapport d'activité peut ensuite être calculé ainsi que ses limites d'erreur pour $p = 0,95$.

B. — Les données discontinues (réponses du tout ou rien) ont également fait l'objet d'une étude statistique.

Lorsque le pourcentage de réponses positives p est transformé en probit Y , la variation devient alors du type $Y = \text{Log}(X)$ où X représente la dose. Les régressions, que nous avons obtenues pour les dosages réalisés dans ce travail, sont généralement linéaires pour un certain intervalle de doses. Les méthodes de calcul statistique appliquées sont celles décrites par EMMENS (1948) (pp. 131 à 168). Le test de χ^2 permet d'estimer la linéarité de la régression. La dose moyenne effective (D50) est la dose qui produit 50 % de réponses positives (probit = 5). Les limites d'erreur de D 50 sont déterminées pour $p = 0,95$. Le parallélisme de deux ou plusieurs régressions est estimé par la détermination de χ^2 . Un rapport d'activité est calculé avec les limites d'erreur pour $p = 0,95$.

VII. — STANDARD

Nous avons utilisé les standards gonadotropes NIH principalement grâce à l'obligeance de l'Endocrinology study Section, N.I.H., Bethesda, Maryland. Nous avons également utilisé les préparations FSH et LH d'origine ovine que le Docteur JUTSZ (C.N.R.S., Gif-sur-Yvette) a mis à notre disposition.

L'activité thyroïdienne est déterminée relativement à une préparation de b-TSH (Armour Lot M-69-112).

[The text in this section is extremely faint and illegible due to low contrast and blurring. It appears to be a list or table of contents with multiple columns.]

CHAPITRE I

PURIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE
DE L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE
COMPARAISON AVEC LES HORMONES GONADOTROPES (LH ET FSH)
DES MAMMIFERES

I. — INTRODUCTION

Les données biochimiques concernant la nature des protéines possédant une activité gonadotrope chez les Poissons Téléostéens sont encore fragmentaires et les connaissances ne sont pas aussi étendues que celles relatives aux hormones gonadotropes des Mammifères pour lesquelles deux hormones de caractéristiques distinctes ont été définies. Quand nous avons commencé ce travail, seul OTSUKA (1957) avait tenté de purifier à partir d'hypophyses de Saumon les hormones gonadotropes. Cet auteur définissait, mais à l'aide des tests d'activité gonadotrope des Mammifères, une LH et une FSH.

Le problème préalable à la purification d'une hormone gonadotrope de Poisson Téléostéen était celui du choix d'une méthode de dosage biologique. Comme nous le verrons, les tests classiques où les receveurs sont des Mammifères ne sont pas utilisables. D'un autre côté, il n'existait pas de méthode simple de dosage sur les Poissons Téléostéens. En conséquence, nous avons choisi comme test la spermiation de la Grenouille qui présente l'intérêt d'être induite à la fois par les hormones gonadotropes des Mammifères et les extraits hypophysaires de Poissons Téléostéens (FONTAINE et CHAUVEL, 1916). Ce manque apparent de spécificité zoologique de réponse, sur lequel nous reviendrons, permettait d'espérer que toutes les substances gonadotropes éventuellement présentes dans l'hypophyse de la Carpe seraient ainsi mises en évidence.

Dans une première série d'expériences (Y. A. FONTAINE et E. GÉRARD, 1963), nous avons préparé, à partir d'hypophyses de Carpe, une fraction gonadotrope sept fois plus active que la poudre de départ, ce qui avait permis d'acquérir les premières données biochimiques concernant une hormone gonadotrope de Poisson.

Ensuite nous avons mis au point un protocole de purification plus complexe qui fournit une poudre vingt à trente fois plus active que l'extrait brut d'hypophyses de Carpe et dont l'activité spécifique est élevée (1,5 U/mg en terme de LH-NHS 1).

Après la description de la purification, nous étudierons l'état d'homogénéité et les caractéristiques biochimiques du matériel purifié. Dans une dernière partie, nous comparerons les données biochimiques obtenues à celles qui concernent les hormones LH et FSH des Mammifères.

II. — PREPARATION

A. — MATÉRIEL DE DÉPART

Le choix de la Carpe a été dicté par la très grande richesse de son hypophyse en activité gonadotrope. Des dosages réalisés sur des extraits hypophysaires d'autres espèces de Poissons

Téléostéens ont montré que la D 50 pour la plupart d'entre eux était plus élevée que celle obtenue dans le cas de la Carpe (tableau II).

TABLEAU II

*Activité gonadotrope des hypophyses de divers Poissons Téléostéens
Détermination de la D 50 par le test de spermiation de la Grenouille*

Nom des Espèces	Etat genital	D 50 (mg)
ANGUILLE <i>Anguilla anguilla</i>	argentée	2.000
	mûre	250
CARPE <i>Cyprinus carpio</i> <i>Aristichthys nobilis</i> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	indetermine	70
		250
		75
SAUMON* <i>Salmo salar</i>	♂ freyag d hiver	5.500
	♀ " "	7.500
PROTOPTERE <i>Protopterus annectens</i>	indetermine	20

* Calculé d'après les données de Fontaine et Chauvel (1964).

B. — TEST BIOLOGIQUE

Le test de spermiation de la Grenouille a été utilisé comme méthode de routine. La possibilité de déterminer rapidement et simplement le pic d'activité après un fractionnement rend l'emploi de ce test particulièrement intéressant, bien qu'il soit souvent critiqué pour son manque de spécificité. En effet, certaines amines, comme l'adrénaline, stimulent à forte dose la spermiation des Batraciens (CRESSERIE et BOVACQUA, 1950). Cependant, au cours des différentes méthodes de fractionnement que nous avons employées, l'activité gonadotrope apparaît être toujours concentrée en un pic unique de protéines. En particulier, la filtration sur Sephadex G 100 d'un extrait brut d'hypophyses de Carpe conduit à l'élution de l'activité gonadotrope en un seul pic possédant un coefficient d'exclusion $K_D = 0,28$. La recherche de l'activité dans les autres fractions, et plus particulièrement dans celle exclue pour $K_D = 1$, s'est révélée négative dans les conditions de dosage utilisées. KILHSTROM et DANNINGE (1970), KILHSTROM et al. (1972) ont suggéré que la spermiation de la Grenouille pouvait être également produite par des facteurs non gonadotropes, présents dans l'hypophyse de nombreux Vertébrés mais représentés en très petite quantité chez les Poissons et les Oiseaux. Ils obtiennent, en effet, une libération de spermatozoïdes dans l'urine des Grenouilles qui reçoivent les extraits hypophysaires (obtenus par traitement à l'acide acétique à 0,25 % à 100 °C suivi d'une lyophilisation, ces extraits secs sont ensuite dissous dans du tampon Ringer et chauffés à 100 °C quelques instants). La nature non gonadotrope de la substance active est suggérée en raison des conditions d'extraction très dénaturantes pour les hormones glycoprotéiques. Nous avons

obtenu un résultat similaire avec l'hypophyse de la Carpe mais 10 % seulement de l'activité biologique de départ est retrouvée, après un traitement excluant l'ébullition à 100 °C de l'extrait final. Il faut noter que ces auteurs injectent des quantités importantes d'hypophyses, d'une part, et que, d'autre part, ils n'obtiennent pas de réponse positive avec l'extrait hypophysaire de Perche.

Cependant, il ne semble pas impossible d'interpréter notre résultat positif avec l'extrait hypophysaire de Carpe de la façon suivante : même si le traitement appliqué au cours de l'extraction conduit à une perte complète de l'activité de l'hormone, celle-ci peut être expliquée par une dissociation de la molécule active en sous-unités inactives (E. BUZAWA-GÉHARD, 1971). Une réassociation au cours de l'évaporation de l'acide acétique ne peut être exclue et rendrait compte de la faible activité biologique retrouvée. Cette évaporation est réalisée au moyen d'un évaporateur rotatif.

C. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DE LA PURIFICATION

1. — Percolation alevolique

La figure 3 représente le diagramme d'éluion obtenu pour l'extraction de 10 g d'hypophyses de Carpe. La quasi-totalité de l'activité biologique est retrouvée dans la fraction soluble pour 57 % d'éthanol - 5 % C12Na. Les dosages biologiques réalisés dans les autres solutions d'extraction n'ont pas permis de déceler la présence d'activité gonadotrope. Cette méthode permet, en une seule étape, d'obtenir une fraction ne représentant que 20 % des protéines présentes dans le matériel de départ et dont l'activité spécifique est de 0,20 U/mg (en terme de LH-NH-S 1). Le rendement est compris entre 70 et 90 %.

2. — Chromatographie sur échangeurs d'ions

Le matériel obtenu après la percolation contient aussi l'activité thyroïdienne et nous avons cherché à la séparer de l'activité gonadotrope.

a) CMC

La chromatographie sur CMC en tampon citrate phosphate pH 5,8 0,04 M en PO_4^{3-} permet de séparer avec un rendement satisfaisant les hormones thyroïdienne et gonadotrope de l'Anguille (Y.-A. FONTAINE, 1969). Des conditions analogues ont été appliquées à la Carpe : plus de 70 % du matériel restent non adsorbés sur la CMC. La recherche dans les fractions adsorbée et non adsorbée montre que 70 % de l'activité est dans la fraction non adsorbée mais que la TSH est aussi présente dans les deux fractions.

b) DEAC

1° En tampon glycinate de sodium pH 9,5 (0,001 M).

Les activités gonadotrope et thyroïdienne sont adsorbées sur la résine. L'éluion est obtenue par l'établissement d'un gradient de force ionique. Les deux activités sont éluées pour une concentration moyenne de 0,1 M en Na.

Deux caractéristiques de la chromatographie sur échangeurs d'ions d'un extrait hypophysaire de Carpe peuvent être dégagées dès à présent : 95 % du matériel protéique restent adsorbés sur la résine montrant ainsi le caractère acide des protéines présentes dans cet extrait, comparées à celui des extraits correspondants des hypophyses de Mammifères (PARLOW et al., 1964). L'activité gonadotrope est absente dans la fraction non adsorbée et elle est représentée par un pic unique dans la fraction adsorbée.

Cependant, la séparation des deux activités gonadotrope et thyroïdienne n'est pas satisfaisante dans ces conditions (fig. 4 A).

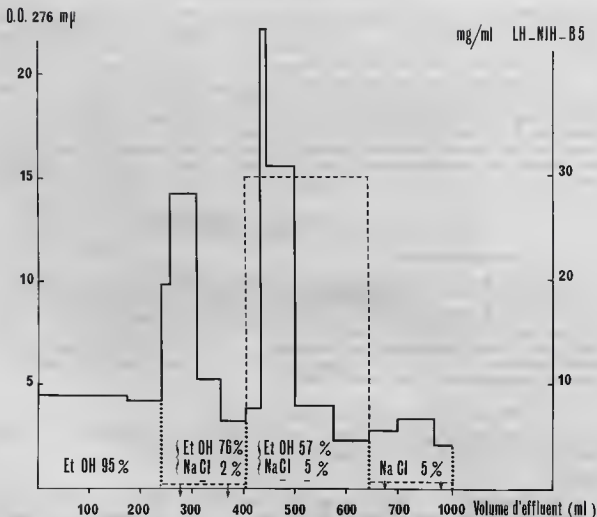


Figure 3

Percolation alcoolique de la poudre acétonique d'hypophyses de Carpe.

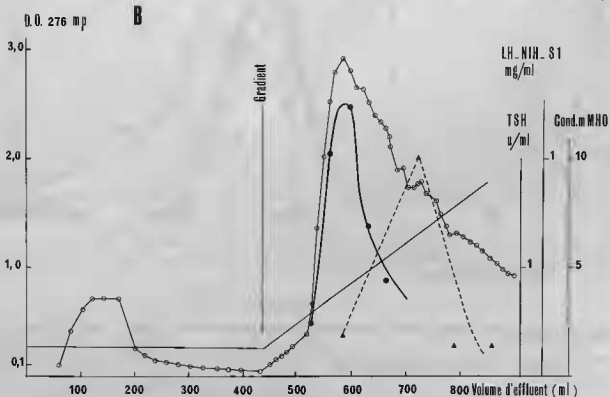
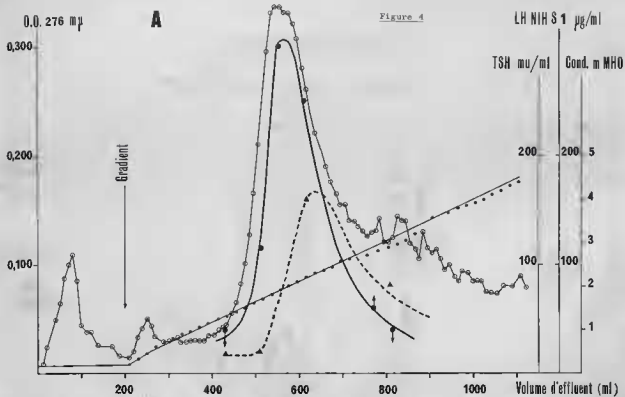
— Protéines (densité optique D.0.276 mμ)

- - - - - Activité biologique exprimée en terme de LH-NIH-B5 par ml.

· · · · · Valeur maximale (aucune grenouille ne répond à la dose injectée).

2° En tampon Tris-HCl pH 7,8 (0,005 M en Tris).

La séparation de la fraction thyroïdrotrope est meilleure mais la fraction gonadotrope reste encore contaminée (fig. 4 B). Une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions de la fraction qui contient la plus grande proportion de l'activité gonadotrope est décrite dans la figure 5. La contamination en TSH de cette fraction a été déterminée sur la poudre lyophilisée finale (après filtration sur Sephadex G 100 en bicarbonate d'ammonium). Elle est faible (60 μ u/mg) et elle représente en poids 3 μ g/mg au maximum. En conclusion, seule la chromatographie sur DEAE-C à pH 7,8 a été retenue. Les protéines éluées dans les deux premiers tiers du pic sont conservées. Nous sacrifions ainsi le rendement en activité pour une moins grande contamination en TSH. La fraction active récupérée après cette étape représente 40 % de l'activité de départ. L'activité spécifique est alors de 0,34 l/mg.



Chromatographie sur DEAE de la fraction active obtenus par percolation et filtration sur G50.

A- adsorption en tampon glycinate de sodium 0,001M en Na⁺ pH 9,2.

B- adsorption en tampon Tris-HCl 0,005M en Tris pH 7,8

Elution par un gradient de force ionique.

A- tampon/glycinate de sodium 0,2M.

B- tampon/NaCl 0,4M.

colonne 25 x 2 cm

○—○ Protéines (Densité optique à 276 mp)

●—● Conductivité (m MHO)

●—● Activité gonadotrope exprimée en terme de LH-NIH-S1

▲—▲ Aucune grenouille ne répond à la dose injectée. La valeur de l'activité biologique est égale ou inférieure à celle du point.

●—● Toutes les grenouilles répondent à la dose injectée. La valeur de l'activité biologique est égale ou supérieure à celle du point.

▲—▲ Activité thyrotréope.

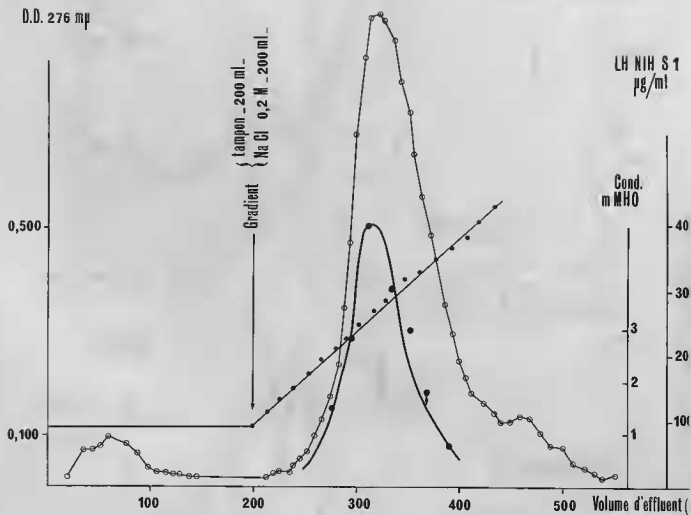


Figure 5

Rechromatographie sur DEAE-C de la fraction active obtenue après une première chromatographie sur DEAE-C (pH 7,8).

L'adsorption est obtenue en tampon Tris-HCl 0,005M en Tris pH 7,8 et l'élué des protéines adsorbées par un gradient d'élué (tampon/NaCl 0,2M) colonne 10 x 2 cm

○—○ Protéines (densité optique 276 mp)

●—● Activité gonadotrope exprimée en terme de LH-NIH-S1 (U/ml)

▼ Aucune grenouille ne répond à la dose injectée. La valeur de l'activité biologique est au plus égale à celle représentée par le point.

3. — Essai de fractionnement par solubilisation fractionnée
après précipitation au sulfate d'ammonium

Les résultats sont représentés dans la figure 6. Par cette méthode une séparation complète des deux activités ne peut être obtenue mais l'activité spécifique de la fraction gonadotrope (après filtration sur Sephadex G 100 et lyophilisation) est élevée (0,6 U. mg en terme de LH-NIH-S 1). Le rendement est inférieur à 30 %. De plus, les différentes expériences réalisées n'ont pas conduit à des résultats reproductibles. Cette méthode n'a pas été retenue.

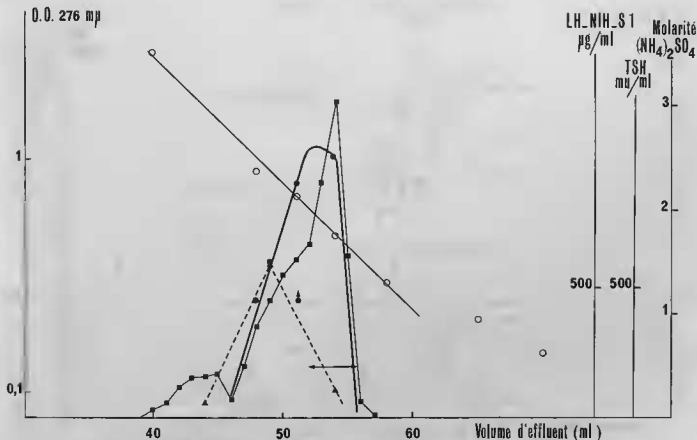


Figure 6

Solubilisation fractionnée après précipitation au sulfate d'ammonium de la fraction active obtenue après chromatographie sur DEAE (pH 7,8)

- Protéines (densité optique D.O. 276 mμ)
- Activité gonadotrope exprimée en terme de LH-NIH-S1 (test de spermiation de la grenouille)
- ▲—▲ Toutes les grenouilles répondent à la dose injectée la valeur de l'activité gonadotrope est au moins égale à celle représentée par le point.
- ▲—▲ Activité thyroïdienne.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, concentration déterminée en fonction de la conductivité.

4. — Filtration sur Sephadex G 100

La purification est poursuivie par une filtration sur Sephadex G 100 en bicarbonate d'ammonium (0,1 M) dans le cas des préparations de type I (G 52 ayant été chromatographié sur DEAE pH 9,2). Deux pics principaux de protéines sont élués avec un coefficient d'exclusion respectivement égal à 0,28, 0,32 et 0,60. L'activité biologique est retrouvée dans le pic exclu le premier (fig. 7).

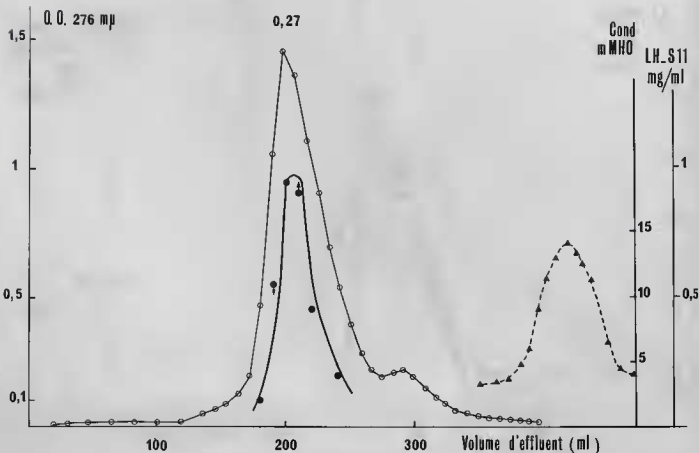


Figure 7

Filtration sur Sephadex G100 de la fraction active obtenue après chromatographie sur DEAE (pH 7,8) tampon NH_4HCO_3 (0,1M)

colonne 112 x 2 cm

○—○ Protéines (densité optique D.O. 276 mμ)

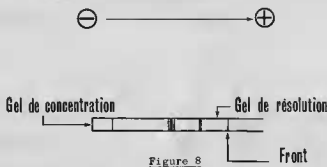
●—● Activité biologique exprimée en terme de LH-NIH-S11 (μg/ml)

▲—▲ Toutes les grenouilles répondent à la dose injectée ; la valeur de l'activité biologique est au moins égale à celle représentée par le point.

▲—▲ Conductivité m MHO.

▼—▼ Aucune grenouille ne répond à la dose injectée ; la valeur de l'activité biologique est au plus égale à celle représentée par le point.

L'état d'homogénéité de ces préparations a été recherché par électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide. Après coloration à l'Amido Schwartz, on observe, d'une part, une zone de protéines avec en général deux bandes plus nettes ($R_f = 0,50 - 0,54$) et, d'autre part, une fine bande ($R_f = 0,80$) (fig. 8). Nous avons cherché à localiser la position de l'activité biologique en la recherchant dans les gels après les avoir découpés en section de 1 mm de hauteur. Elle est décelable dans la zone de protéines de R_f compris entre 0,50 et 0,54. Les protéines de $R_f = 0,80$ apparaissent inactives dans les conditions de cette expérience. L'activité biologique semble être conservée après l'électrophorèse sur un support tel que le gel de polyacrylamide : en conséquence, l'application d'une méthode d'électrophorèse préparative pouvait être envisagée.



Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide de la préparation BG 121 (type III)

tampon Tris-glycine pH 8,3 0,005M en Tris

durée 1 h 30

Intensité I = 2,5 mA

Les protéines sont révélées par l'Amido-Schwartz après migration et le front est visualisé par le bromophénol.

5. — *Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide*

Les protéines à séparer sont précédemment filtrées sur Sephadex G 100 en tampon Tris-phosphate pH 7,2 (0,05 M en Tris). Par électrophorèse préparative, une bonne séparation de la fraction la plus électro-négative est obtenue. Le maximum de l'activité gonadotrope est retrouvé pour le maximum de protéines. Le R_f est de 0,50 - 0,54 (fig. 9). L'activité gonadotrope a été aussi étudiée au moyen du test d'hydratation du testicule du Cyprin (CLEMENS et GRANT, 1964). Les maximums des pics d'activité déterminés, d'une part sur la Grenouille et d'autre part sur le Cyprin, sont confondus. Nous observons de plus que les protéines les plus électro-négatives ne sont actives ni sur le premier receveur ni sur le second.

L'activité thyrotrope a été également recherchée après ce fractionnement. Celle-ci n'a pas été retrouvée dans les conditions employées.

Quatre fractions (A), (B), (C) et (D) ont été recueillies à la suite de l'électrophorèse. Elles ont été concentrées à l'évaporateur rotatif, filtrées sur Sephadex G 100 en NH_4HCO_3 0,1 M, puis lyophilisées. Leurs activités biologiques sont résumées dans le tableau III.

TABLEAU III

Activité gonadotrope des fractions séparées par électrophorèse préparative après filtration sur Sephadex G 100 et lyophilisation

FRACTIONS	[A]	[B]	[C]	[D]
Activité gonadotrope U/mg	<0,03	0,87	1,50	0,65

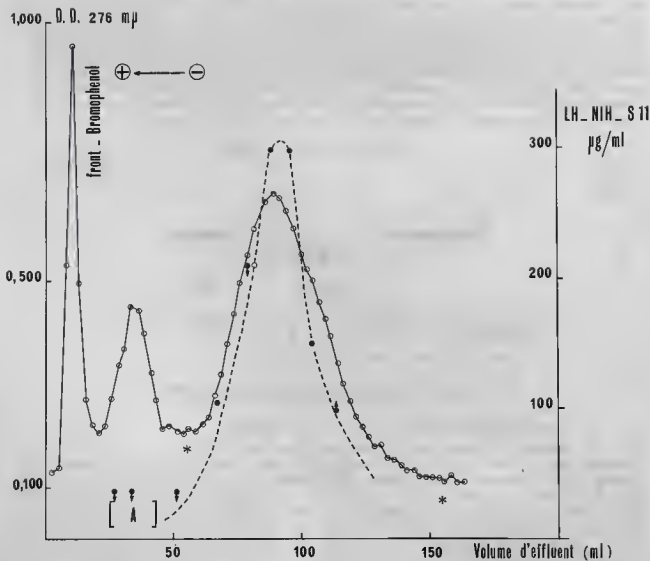


Figure 9

Electrophorèse préparative sur gel polyacrylamide de la fraction obtenue après filtration sur Sephadex G100 - la migration se fait vers l'anode, le front est visualisé par le bromophénol en tampon Tris-glycine 0,36M en Tris pH 10,3.

- V = 200 volts au début de l'expérience I = 40 mA constante.
- colonne: gel de résolution h = 38 mm (7,5 % acrylamide monomère)
gel de concentration h = 20 mm (1,25 % acrylamide monomère)

- A la base de la colonne les protéines sont entraînées en tampon Tris-HCl 0,1M en Tris pH 8,1 à un débit de 26 ml/h.

- — Protéines exprimées en fonction de la densité optique à 276 mμ.
- - - - Activité biologique en terme de LH-NIH-S11 (spermiation de la grenouille).
- ▲ — Toutes les grenouilles répondent à la dose injectée.
- ▼ — Aucune des grenouilles ne répondent à la dose injectée.

* La densité optique après élution d'un pic de protéine ne revient pas à 0,00 en raison de l'entraînement de certaines particules de gel adsorbant à 276 mμ. Celles-ci seront éliminées dans le pic de sel au cours de la filtration sur Sephadex suivante.

6. — Résumé

L'application de ces diverses techniques de fractionnement a permis d'élaborer un protocole (tableau IV) conduisant à la préparation d'une, et d'une seule, fraction hautement purifiée possédant une activité gonadotrope élevée.

TABLEAU IV

Schéma de la purification

PERCOLATION ALCOOLIQUE

Fraction soluble dans
Concentration

{ 57 % EtOH
5 % NaCl

FILTRATION SUR SEPHADEX G 50

[Tampon Tris-HCl pH 7.8 (0.05 M Tris)]

Fraction active éluee par un gradient de force ionique (tampon NaCl 0,4 M) pour une conductivité comprise entre 3.1 et 3.9 m MHO
Concentration

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-EC

[Equilibrée en tampon Tris-HCl pH 7.8]

Fraction active éluee par un gradient de force ionique
Concentration

FILTRATION SUR SEPHADEX G 100

[Equilibrée en tampon Tris-phosphate pH 7,2 (0.0587 M Tris)]

Fraction active éluee pour K_D compris entre 0.26 et 0.32

ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Migration vers l'anode en tampon Tris-glycine
pH 10.3 (0.36 M Tris)

Fraction active pour $R_f = 0.54$
Concentration

FILTRATION SUR SEPHADEX G 100

Pic actif ($K_D = 0.28$)

Lyophilisation

Pour la suite de ce travail, nous avons utilisé différentes poudres ayant été préparées selon des protocoles distincts. Nous donnons dans le tableau V la désignation et le mode de séparation utilisés pour chacune d'entre elles avec les activités spécifiques obtenues après chaque étape importante.

TABLEAU V
*Activités gonadotropes (U. I.H.-NIH-S 1) des principes préparatoires
 obtenues aux étapes principales de leur purification*

	DEAE-C pH 9,2	DEAE-C pH 7,8	II ^{ème} DEAE-C pH 7,8	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sephadex G 100	Electrophorese preparative
Type I G 52	0,25				→ 0,30	
Type II G 139-G 164		0,30		→ 0,60		
Type III GG 121 GG 2-154		0,30	0,60		→ 0,74	
Type IV GG 2-67 GG 2-116		0,30			→ 0,50	→ 1,50

III. — ETUDE DE L'ETAT D'HOMOGENEITE

L'état d'homogénéité des préparations de types I et IV a été étudié par filtration sur Sephadex G 100, ultracentrifugation dans un gradient de saccharose et par électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide. De plus, quelques essais concernant les caractères immunologiques de cette protéine ont été réalisés sur les préparations de types II et IV.

A. — FILTRATION SUR SEPHADEN G 100

Elle constitue la dernière étape de la purification et permet de sélectionner les molécules essentiellement en fonction de leur poids moléculaire. La figure 10 représente les résultats obtenus pour la préparation de type IV. Le pic de protéine n'est pas parfaitement symétrique (présence d'un épaulement « E ») et l'activité spécifique est plus faible dans la partie descendante que dans la partie ascendante de ce pic). En conséquence, seules les protéines exclues dans la première partie du pic ont été conservées. Les critères d'ultracentrifugation et d'électrophorèse analytique ont été réalisés sur cette poudre finale.

Une nouvelle filtration de ce matériel révèle la seconde apparition de l'épaulement (fig. 11 B). Les coefficients d'exclusion sont de $K = 0,28$ pour le pic principal et $K = 0,42$ pour l'épaulement. Les rayons de Stokes correspondant ont été calculés selon COURTE (1970) $R_1 = 31,3$ Å et $R_2 = 24,6$ Å. La préparation apparaît donc être contaminée par une protéine de poids moléculaire plus faible.

B. — ULTRACENTRIFUGATION DANS UN GRADIENT DE SACCHAROSE

L'ultracentrifugation de la préparation de type I (G 52) a été réalisée et nous avons simultanément dosé sur les différentes fractions les protéines et l'activité biologique. Nous avons observé que les courbes représentant l'activité biologique et les protéines sont superposées. Relativement au pepsinogène, le poids moléculaire de la préparation est de 33.000 environ (E. BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1966). Une ultracentrifugation de la préparation hautement purifiée de type IV

BG 2-67 a aussi été effectuée et les résultats obtenus sont représentés figure 11 A. Un épaulement « E » apparaît ici également suggérant aussi la présence dans la préparation d'une protéine contaminante possédant un poids moléculaire inférieur. Les taux de sédimentation du pic principal de protéine et de l'épaulement sont respectivement de 2,6 et 1,8 correspondant à des valeurs d'environ 29.000 et 17.000 pour les poids moléculaires.

C. — ELECTROPHORÈSE ANALYTIQUE

Nous observons la présence de deux bandes principales dont les coefficients de partage sont respectivement de 0,50 à 0,54 et de 0,80. Par ce critère faisant intervenir la charge en plus du poids moléculaire, nous voyons apparaître une nouvelle fois des protéines de $R_f = 0,80$ que nous avons pourtant éliminées au cours de l'électrophorèse préparative.

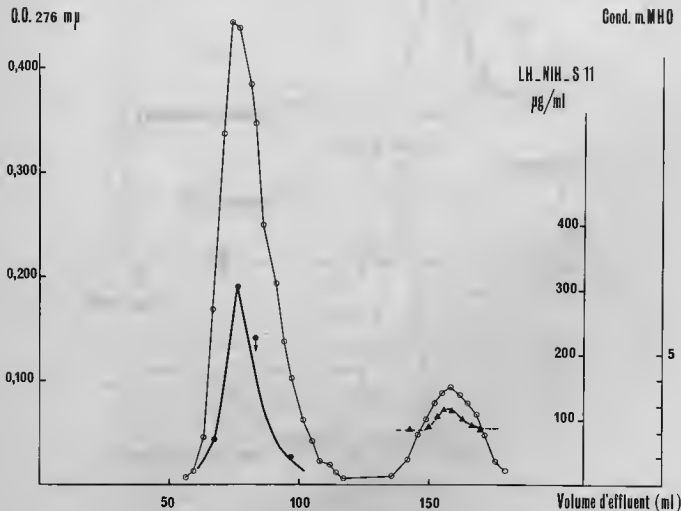


Figure 10

Filtration sur Sephadex G100 de la préparation BG 2-67

- Protéines (densité optique D.O. 276 mμ)
- Activité biologique exprimée en terme de LH-NIH-S11 (μg/ml)
- ↓ Aucune grenouille ne répond à la dose injectée, la valeur de l'activité biologique est au plus égale à celle du point.
- ▲—▲ Conductivité m MHO.

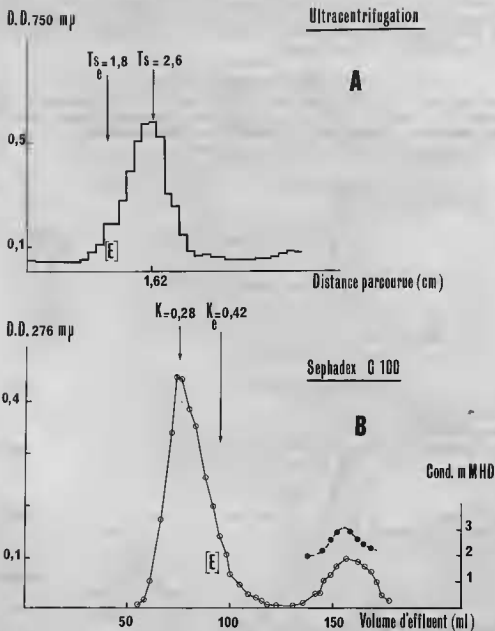


Figure 11

- A- Ultracentrifugation dans un gradient de saccharose de la préparation BG 2-67 (type IV)
 (15 h à 65.000 t/mn) Centrifugeuse Spinco Mod. L/L2 Rotor SW65
 Protéines densité optique D.O. 750 m μ après réaction de Lowry-Folin
- B- Filtration sur Sephadex G100 de la préparation BG 2-67 (type IV)
 Protéines densité optique D.O. 276 m μ .
 Conductivité (m MHO)

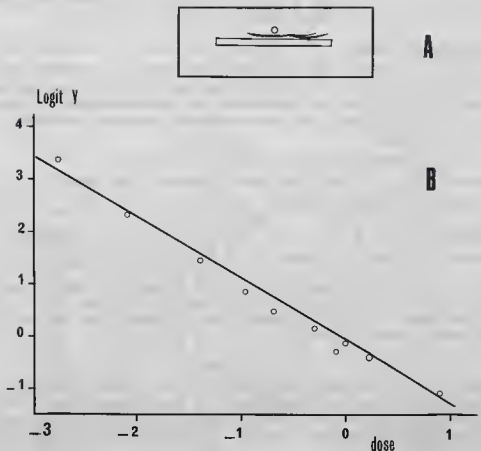


Figure 12

Etude immunologique de la glycoprotéine gonadotrope de la Carpe

A- Immunoélectrophorèse sur gel d'agar

- 5 μ l de la solution antigénique (2 mg G139 dans 1 ml en tampon véronal pH 8,6) sont placés dans le réservoir.
- la migration électrophorétique est réalisée pendant 1 h 30 sous 250 volts à 2 à 3 mA.
- 100 μ l de sérum sont placés dans le canal central.
- les plaques sont colorées à l'Amido Schwartz et l'excès de colorant est éliminé par rinçage dans une solution de formol.

B- Radioimmunologie

Le complexe Anticorps-Antigène est étudié en présence de l'hormone marquée à ^{131}I (préparation BG2-67)

Les variations du logit Y sont représentées en fonction du logarithme de la dose d'hormone mise dans chaque tube

$$\text{Logit Y} = \text{Log} \frac{Y}{1-Y} \quad \text{ou} \quad Y = \frac{B}{B_0}$$

B représente le nombre de coups par minute (cpm) correspondant à l'hormone marquée liée à l'anticorps

B₀ représente le nombre de coups par minute de l'hormone marquée liée en présence d'hormone froide.

D. — ESSAI IMMUNOLOGIQUE

Les préparations G 139 (type II) et BG 2-67 (type IV) ont été injectées, la première à un Lapin et la deuxième à un Cobaye, afin de préparer l'antisérum correspondant.

1. — *Immuno-électrophorèse*

Les résultats expérimentaux sont représentés sur la figure 12 A. Le schéma observé a été obtenu avec la préparation G 139 et le sérum de Lapin anti-G 139. Deux lignes de précipitation principales sont mises en évidence, elles correspondent aux deux zones révélées sur gel de polyacrylamide ($R_f = 0,50$ et $0,80$). Ces arcs ne se croisent pas, ce qui montre qu'il s'agit de protéines immunologiquement voisines.

2. — *Test radio-immunologique*

L'antisérum utilisé ici a été obtenu après immunisation d'un Cobaye par BG 2-67. La variation du rapport $\frac{B}{F}$ (hormone liée hormone libre) a été recherchée en fonction de la concentration hormonale du milieu d'incubation (B. BRETON et al., 1971). La régression est linéaire lorsqu'on transforme la donnée expérimentale de $\frac{B}{B_0}$ en logit Y que l'on porte en ordonnée, le logarithme de la dose d'hormone étant porté en abscisses (MIDLEY et al., 1969). L'application de cette transformation à notre système (fig. 12 B) donne une droite de pente $b = -1,17$ avec un coefficient de corrélation $r = 0,995$. Ce résultat permet de conclure que l'anticorps est monocomposite (B. BRETON, données inédites).

E. — RÉSUMÉ

Les préparations les plus purifiées contiennent toujours à côté de la substance active un contaminant inactif de comportement électrophorétique et d'encombrement moléculaire très différents de ceux du facteur actif. Cependant, ce contaminant [fraction (A)] semble bien provenir de la fraction principale et il possède des propriétés immunologiques communes avec celle-ci.

IV. — CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES

Nous avons recherché la composition chimique (acides aminés, sucres) et déterminé certaines constantes physico-chimiques du produit purifié. Cette étude a été complétée par quelques essais concernant la structure quaternaire de cette molécule protéique.

A. — COMPOSITION CHIMIQUE

1. — *Composition en acides aminés*

Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de résidus et en résidus pour 100 résidus analysés (tableau VI). La comparaison des concentrations en acides aminés des diverses préparations à des états de pureté légèrement différents ne met en évidence que peu de différences. En fonction du degré de pureté des préparations, la concentration en acide glutamique diminue tandis que celles en glycine, leucine et surtout en valine augmentent : la méthionine reste particulièrement constante. La phénylalanine a une concentration très élevée pour l'analyse de la préparation BG 2-36 (type II) mais cette valeur peut être surestimée, car la glucosamine dans les conditions de cette analyse était mal séparée de la phénylalanine.

2. — *Composition en glucides*

Les sucres en C₄ - C₅, les sucres aminés (glucosamine et galactosamine) ont été recherchés. Les résultats obtenus pour différentes préparations sont résumés dans le tableau VII. La détermination de l'acide sialique a été réalisée par le Docteur ROBERT.

Ces résultats montrent que la substance gonadotrope purifiée à partir de l'hypophyse de la Carpe est une glycoprotéine.

B. — CONSTANTES PHYSICO-CHIMIQUES

1. — Poids moléculaire

Le taux de sédimentation de différentes préparations a été déterminé par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Une valeur approximative du poids moléculaire peut en être déduite

TABLEAU VI

Composition en amino-acides de différentes préparations de la glycoprotéine gonadotrope (nombre de résidus et nombre de résidus pour 100 résidus analysés)

Amino-acides	Concentration pour 1 seul temps d'hydrolyse (22 h)						valeur extrapolée	
	G 52 type I		BG 1-36 type II		BG 2-67 type IV		BG 2-67 type IV	
	R	R/100	R	R/100	R	R/100	R	R/100
LYS	12,2	7,4	10,8	7,1	10,3	6,7	11,3	6,7
HIS	5,3	3,2	4,5	2,9	5,3	3,4	5,4	3,2
ARG	6,0	3,6	6,0	3,9	6,4	4,1	7,0	4,1
ASP	15,3	9,3	14,7	9,7	13,4	8,7	14	8,4
THR	13,3	8,1	11,5	7,6	12,5	8,1	13	7,7
SER	12,2	7,4	11,3	7,4	10,4	6,7	11,5	6,8
GLU	18,4	11,2	17,3	8,6	15,0	9,7	15,5	9,2
PRO	14,4	8,8	13,1	11,4	14,1	9,1	14	8,3
GLY	5,1	3,1	5,0	3,3	5,9	3,8	6,5	3,9
ALA	4,2	2,6	4,8	3,2	4,7	3,1	6,4	3,8
1/2 CYS	15,3	9,3	12,4	8,2	9,1	5,9	11,5	6,9
VAL	11,7	7,1	9,3	6,1	17,2	11,2	19,4	11,5
MET	2,7	1,6	2,6	1,7	2,6	1,7	2,6	1,5
ILE	3,3	2,0	3,0	2,0	4,7	3,1	4,8	2,8
LEU	10,8	6,6	9,2	6,1	10,7	6,9	12,5	7,4
TYR	8,4	5,1	7,3	4,8	7,6	4,9	8,1	4,8
PHE	4,2	2,6	8,8	5,8	4,6	3,0	4,7	2,8
Rendement	71%		76%		70%		73%	

par comparaison avec les protéines standards (lysozyme et pepsinogène) dont les poids moléculaires encadrent celui de la protéine inconnue. Les résultats sont résumés dans le tableau VIII. Le taux de sédimentation, comme le poids moléculaire, sont légèrement différents pour les différentes expériences. Relativement au pepsinogène, le poids moléculaire de la préparation G 52 est de 33.470 alors que celui des préparations BG 121 et BG 2-116 sont respectivement de 25.000 et 27.100. Ces différences peuvent être dues au degré de pureté plus élevé des préparations BG 2-116 et BG 121 mais il faut se souvenir que la détermination d'un taux de sédimentation n'est faite par cette méthode qu'avec une certaine imprécision (déviations standard environ 6 %) (FONTAINE et CONDLIFFE, 1964). La détermination de TS a sans doute été meilleure dans le cas de BG 2-116 et BG 121 (centrifugation plus courte, à vitesse plus élevée entraînant une diffusion réduite).

D'un autre côté, la détermination du poids moléculaire n'est valable que si on compare la substance à étudier à un standard de forme similaire. Nous avons effectué une autre expérience en utilisant comme standard une hormone gonadotrope de Mammifère, la LH, qui est aussi une glycoprotéine et dont on peut penser, comme nous le verrons, qu'elle présente des similitudes avec la glycoprotéine gonadotrope de Carpe. Les distances parcourues sont respectivement de 2,57 cm

TABLEAU VII
Composition en glucides de différentes préparations de la glycoprotéine gonadotrope
(g 100 g de protéine)

	Type I	Type II
Hexoses	8,6%	
Hexosamines totales	4,9%	
Galactosamine	2,2%	2,7%
Glucosamine	1,1%	1,1%
Pentose (fucose)	+	+
Acide sialique		0,35%

* Le dosage quantitatif n'a pas été réalisé.

** Déterminé par le Docteur Robert.

TABLEAU VIII
Taux de sédimentation et poids moléculaire de différentes préparations de la glycoprotéine déterminés par ultracentrifugation en gradient de saccharose

	PREPARATIONS	tours/mn	distance parcourue(cm)	taux de sédimentation	Poids Moléculaire de Standard	Poids moléculaire de la glycoprotéine en fonction du standard
Exp I	652 - type I	38.000 [21h]	0.86	2.9		
	Pepsinogène	38.000 [21h]	1.04	3.4 *	41.000 *	33.400
Exp II	86121 - type III	65.000 [15h]	2.15	2,44-2,67		
	Pepsinogène	idem	2.99	3.4	41.000	25.000
	Lysozyme	idem	1.54	1.91 *	14.000 *	23.100
Exp III	862-116 -type IV	idem	1.62	2.55		
	Pepsinogène	idem	2.16	3.4	41.000	27.100
Exp IV	862-154 -type III	idem	2.57	2.27		
	LH M2	idem	2.74	2,42 **	29.000 à 30.000**	26.400 à 27.300

* Selon Y. A. Fontaine et P. G. Condiffe (1964).

** Selon Courte (1970).

pour cette dernière et 2,74 cm pour la LH. D'après COURTE (1970), le taux de sédimentation et le poids moléculaire de la LH sont de 2,42 et 29.000 - 30.000. Pour la glycoprotéine de Carpe, les valeurs de ces paramètres seraient donc de 2,30 et 26.000 - 27.000.

2. — *Point isoélectrique*

La glycoprotéine gonadotrope, par son comportement au cours de la préparation, manifeste un caractère acide très net et, de plus, nous observons que, placée en tampon citrate-phosphate pH 5, elle précipite. Son point isoélectrique pHi peut être estimé voisin de 5.

Une détermination plus précise a été réalisée au moyen d'une électrophorèse par isofocalisation. Celle-ci a été réalisée grâce à l'amabilité du Docteur REYBEROTTE (Hôpital Broussais).

Le maximum de la courbe représentant l'activité biologique correspond à un pH de 5,1. Nous n'avons pas retenu l'emploi de cette méthode pour la purification, car la préparation précipite à son point isoélectrique et une forte perte d'activité biologique se produit alors.

C. — *STRUCTURE QUATERNAIRE*

Les résultats obtenus suggèrent une certaine labilité de la glycoprotéine active. L'étude de l'homogénéité de la préparation la plus pure (type IV), en particulier, suggère qu'une transformation de cette molécule en une molécule inactive de poids moléculaire moitié moindre a lieu dans certaines conditions. L'existence d'une structure quaternaire a été recherchée au moyen de l'action d'agents dissociants. Les transformations qui peuvent se produire ont été étudiées par ultracentrifugation et filtration sur G 100. La recherche de l'activité biologique a été conduite simultanément.

1. — *Action de l'urée*a) *Sur l'activité biologique*

L'activité biologique de la préparation BG 121 (type III) a été recherchée par le test de spermiation de la Grenouille après traitement de la solution à l'urée 6 M pendant 20 heures à 37 °C. Deux solutions témoins ont été simultanément dosées : la première sans aucun traitement préalable, la seconde après incubation à 37 °C pendant 20 heures en l'absence d'urée.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Influence de l'urée sur l'activité biologique de l'hormone gonadotrope de la Carpe

0 50 (µg/grenouille)	0 50 (µg/grenouille)	0 50 (µg/grenouille)
Témoin non incubé	Incubation à 37°C (20 h) tampon phosphate pH 7.0	Incubation à 37°C (20 h) tampon phosphate pH 7.0 urée 6M
4.1 [2.8 - 5.8]	9.8 [7.7 - 12.4]	45.0

L'activité biologique est fortement diminuée après traitement à l'urée. L'incubation à 37 °C entraîne à elle seule une diminution nette de l'activité gonadotrope mais elle ne permet pas d'expliquer celle plus importante, observée avec l'urée.

b) *Sur l'encombrement moléculaire*

L'hormone lutéinisante de Mammifères est dissociée en deux sous-unités par l'urée 8 M ; celles-ci ne possèdent qu'une activité biologique très réduite (environ 10 % de celle de la molécule

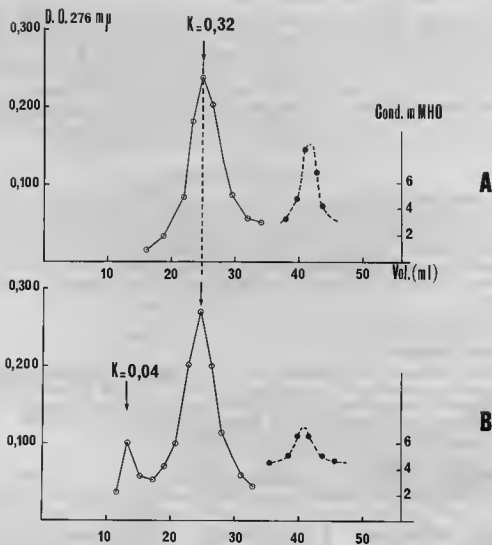


Figure 13

Filtration sur Sephadex G100 de la préparation BG 121 (type III)

colonne 0,7 x 70 cm

tampon Tris phosphate pH 7,1

A BG 121 (type III)

B BG 121 (type III) préalablement incubé 24 h dans l'urée 8M.

○—○ Protéines (densité optique D.O. 276 mμ)

●-● Conductivité m MHO

native) (de la LLOSA et al., 1967). Il pouvait en être de même pour la glycoprotéine gonadotrope de Carpe. Nous avons recherché au moyen de tests biochimiques si l'urée ne produisait pas une dissociation de cette molécule.

La préparation BG 121 (type III) est incubée dans l'urée 8 M à 25 °C pendant 24 heures puis filtrée sur Sephadex G 100 en tampon Tris-phosphate pH 7,1. La même préparation (sans traitement à l'urée) est filtrée sur Sephadex G 100 dans les mêmes conditions.

Les résultats sont représentés figure 13. La filtration témoin conduit à l'exclusion d'un pic ($K_D = 0,32$) qui correspond à celui déterminé pour la glycoprotéine gonadotrope. La filtration du produit incubé conduit à l'éluion de deux pics d'importance différente. Le premier, dont le coefficient d'exclusion $K_D = 0,04$, très voisin du zéro, correspond à des protéines de poids moléculaire supérieur à 70.000. Cette fraction représente environ 10 % du matériel de départ. Le deuxième pic est élué pour un coefficient d'exclusion $K_D = 0,32$, c'est-à-dire celui de la molécule native.

2. — Effet du changement de pH

a) Sur l'activité biologique

L'activité biologique des différentes préparations gonadotropes a été généralement recherchée dans une solution de NaCl (0,1 M) et de pH 7,4. Nous avons recherché ce qu'elle devenait après incubation pendant une heure à la température ambiante à des pH variables, la molarité étant toujours égale à 0,1 M. Cette étude a été réalisée sur la préparation BG 2-154 (type III). L'activité biologique est fortement diminuée lorsque le pH devient égal ou inférieur à 5 (fig. 14).

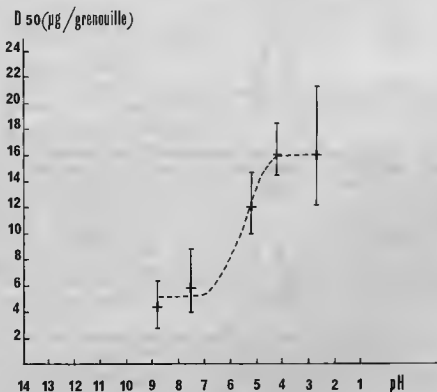


Figure 14

Variation de la dose moyenne effective (D₅₀) de la préparation gonadotrope BG2-154 (type III) en fonction du pH.

D₅₀ ± erreur type de la moyenne
tampon phosphate (0,1M) de pH9 à pH5.
tampon glycine-HCl (0,1M) pour les pH les plus acides.

b) Sur l'encombrement moléculaire

L'expérience a été réalisée en utilisant trois tampons de pH différents (2,2 - 7,4 - 10,6) mais ayant même molarité (0,1 M). La préparation BG 2-67 (type IV) a été utilisée (500 µg sont dissous, incubés pendant une heure à la température ambiante et soumis à une ultracentrifugation

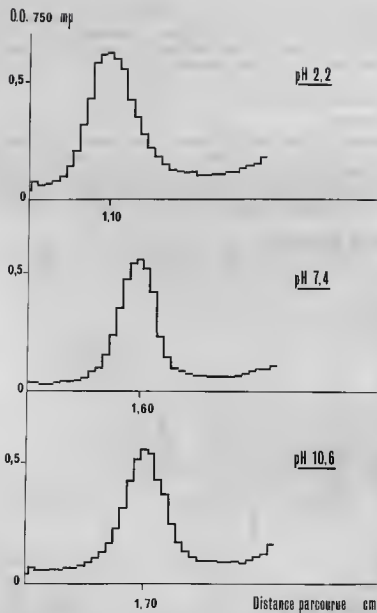


Figure 15

Ultracentrifugation de la préparation BG 2-67 (type IV) à différents pH.

15 h à 65.000 t/mn centrifugeuse Spinco Modèle L/L2 Rotor SW 65.

tampon pH 2,2 (HCl 0,1M-KCl 0,1M)
 tampon pH 7,4 (phosphate de sodium-NaCl 0,1M)
 tampon pH 10,6 (Na-OH 0,1M-glycine 0,1M)
 Protéines (densité optique D.O. 750 mμ
 après réaction de Lowry-Folin.

en gradient de saccharose dans le tampon considéré). Le taux de sédimentation a été déterminé pour chaque échantillon. Les résultats sont représentés figure 15. Le taux de sédimentation à pH 7,4 ou à pH 10,6 est de 2,5 - 2,7 mais il est de 1,75 à pH 2,2. Le diagramme d'éltion des protéines centrifugées à pH 2,2 n'est pas symétrique. L'existence de protéines ayant encore le taux de sédimentation de l'hormone native doit être à l'origine de cette dissymétrie.

L'activité biologique est, comme nous venons de le voir, fortement diminuée mais non totalement disparue à pH 2,6 ; par contre, il semble bien que cette activité n'est pas modifiée à pH 9 - 10 (cf. purification). Ceci suggère que seules les protéines de taux de sédimentation égal à 2,5 - 2,7 possèdent l'activité biologique.

Ces résultats indiquent l'existence, à pH fortement acide, d'un changement dans la conformation de la molécule. Il s'accompagnerait d'une variation dans le poids moléculaire. Une telle variation peut traduire une dissociation de la molécule en deux sous-unités.

3. — Action de l'acide propionique M

Nous avons recherché également l'action de l'acide propionique M sur nos préparations. Cet acide est utilisé par LIAO et PIERCK (1970) pour la h-TSH et par PAPKOFF et EKBLAD (1970) pour la o-FSH afin de séparer les deux sous-unités de ces glycoprotéines hormonales.

a) Influence sur l'activité biologique

Après incubation de BG 2-154 (type III) dans l'acide propionique M pendant 15 heures à température ambiante, la D 50 passe de 5,6 (4,2 - 8,0) μ g à 20,1 (15,6 - 26,9) μ g.

b) Influence sur l'encombrement moléculaire

Nous l'avons recherché au moyen de la technique d'ultracentrifugation en gradient de saccharose. Trois préparations ont été utilisées simultanément : la préparation gonadotrope de la Carpe BG 2-154 (type III), la FSH-M 2 (C.N.R.S.) qui dans ces conditions est dissociée et la préparation BG 2-69 qui est la fraction inactive (Rf = 0,80) obtenue après électrophorèse préparative. Cette dernière est, comme nous le verrons, une protéine homogène dont les caractéristiques en ultracentrifugation sont connues (TS = 1,81 - PM = 15.800). Elle sera considérée ici comme standard. Le gradient de saccharose est établi en milieu propionique M et les différentes préparations, après avoir été placées 15 heures dans l'acide propionique M, sont centrifugées 15 heures à 65.000 tr/min. Les taux de sédimentation sont alors déterminés en fonction de la protéine standard. Ils sont égaux à 1,65 pour la glycoprotéine de la Carpe BG 2-154 et à 1,55 pour la FSH-M 2 (C.N.R.S.).

La FSH dans ces conditions est, on le sait, dissociée en ses deux sous-unités (le taux de sédimentation mesuré correspond effectivement à un poids moléculaire de 13.500 environ).

La glycoprotéine de Carpe manifeste un comportement semblable. Le maximum de la courbe des protéines est obtenu pour une valeur de 1,65 du taux de sédimentation correspondant à un poids moléculaire d'environ 15.800. Ceci suggère que, comme dans le cas de la FSH, une dissociation de la molécule native a lieu avec libération des sous-unités de poids moléculaire moitié moindre. La protéine de référence qui est ici la préparation BG 2-69 (cf. tableau X) manifeste le même comportement au cours de l'ultracentrifugation à pH 7,4 et en milieu propionique M. La distance parcourue par le pic n'est pas très différente lors des deux expérimentations.

4. — Essai de réassociation

Chez les Mammifères, les hormones glycoprotéiques dissociées peuvent être réassociées et retrouver les caractéristiques biologiques et biochimiques de l'hormone native (de la LLOSA et al., 1967, PIERCE et al, 1970, PAPKOFF et EKBLAD, 1970).

En ce qui concerne la glycoprotéine gonadotrope de la Carpe, les conditions de réassociation décrites pour les Mammifères ne sont pas satisfaisantes. En effet, la seule incubation de l'hormone native à 37 °C produit une perte importante de l'activité biologique. Des résultats positifs ont toutefois été obtenus par simple élimination de l'agent de dissociation.

a) Nous avons observé que l'hormone traitée à l'acide propionique M, puis lyophilisée et redissoute à pH 7,4 retrouve le même taux de sédimentation que la molécule native (2,50 au lieu de 2,54).

b) Les résultats sont moins nets en ce qui concerne la réapparition de l'activité biologique. La D 50 de la solution traitée puis lyophilisée diminue, mais seulement de 20 à 15 µg. L'hypothèse de l'existence d'une structure quaternaire de la glycoprotéine purifiée, que nous avons formulée précédemment, peut être considérée favorablement. Cependant, les conditions optimales de restauration de l'activité par réassociation des sous-unités devront être recherchées.

5. — Propriétés de la fraction (A) obtenue après l'électrophorèse préparative

Au cours de l'électrophorèse préparative, une fraction (A) (RI = 0,80) est séparée des protéines possédant l'activité biologique. Certaines de ses caractéristiques biochimiques ont été recherchées et sont résumées dans le tableau X. La fraction (A) présente les caractéristiques d'une protéine

TABLEAU X

Comparaison des constantes biochimiques et de l'activité biologique de la glycoprotéine hormonale et de la fraction (A)

METHODES		FILTRATION sur SEPHADEX G 100		ULTRA CENTRIFUGATION		ELECTROPHORESE ANALYTIQUE		ACTIVITE BIOLOGIQUE [test de spermiation de la grenouille]
CONSTANTES		K _D	Rayon de Stokes r (Å)	TS	P. M.	pH i	Rf	0,50 (µg/grenouille)
c-6TH		0,28 (0,26-0,32)	31,3	2,57	27.000	5,1	0,50-0,54	5,0
c-6TH	pH 2,2			1,7	15.400		grad. Nomb. de bandes	20
	urée 8M	0,32	30,8					45
	Ac. propionique M			1,6	13.800			20
FRACTION (A)		0,40 (0,38-0,42)	24,6	1,8	15.800	4,4	0,80	> 100

homogène. Les diagrammes obtenus sur Sephadex et ultracentrifugation sont symétriques. Une seule bande est présente sur les gels analytiques d'électrophorèse sur polyacrylamide dans les conditions où nous l'employons. Le coefficient d'exclusion sur Sephadex G 100 est 0,42, le rayon

de Stokes est de 24,6 Å. Le taux de sédimentation, déterminé par ultracentrifugation en gradient de saccharose est de 1,8 (relativement au pepsinogène) correspondant à un poids moléculaire de 15.800.

Ces données ont été comparées dans le tableau X à celles obtenues pour la glycoprotéine native ou traitée par divers agents chimiques. Nous observons ainsi que certaines données (poids-moléculaire et TS) peuvent être rapprochées de celles définies pour la glycoprotéine traitée par des agents dissociants.

Nous avons également comparé la composition en acides aminés de la glycoprotéine gonadotrope et de la fraction (A). Les analyses ont été réalisées pour trois temps d'hydrolyse 24, 48 et 72 heures et la concentration de chaque acide aminé a été extrapolée à sa valeur maximale. Les résultats sont représentés graphiquement (fig. 16). Nous avons exprimé ici le nombre de résidus pour 100 résidus analysés, de sorte que si les deux préparations possédaient la même composition, aucune variation ne serait observée. Des différences apparaissent pour certains acides aminés : la lysine, la cystine, l'alanine, la tyrosine et la phénylalanine sont moins abondantes dans la fraction (A) tandis que l'acide glutamique, la proline et la thréonine y sont présents

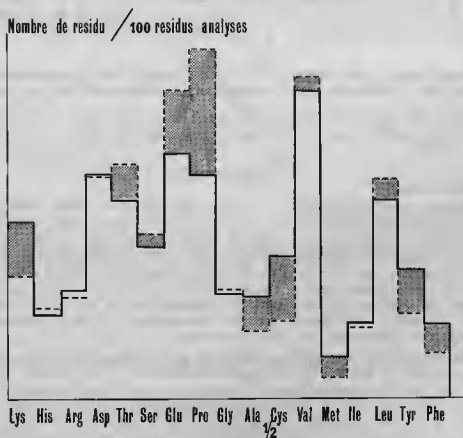


Figure 16

Comparaison de la composition en acides aminés (exprimés en résidus/100 résidus) entre la fraction (A) et la préparation BG 2-67 (type IV)

----- BG 2-68

----- Fraction (A)

■ Différence entre les deux valeurs des concentrations pour un acide aminé.

en plus grand nombre. D'autres différences existent mais elles sont moins importantes et peuvent être imputées à l'erreur expérimentale. L'ensemble de ces résultats pourrait s'expliquer en supposant que la fraction (A) représente l'une des deux sous-unités vraisemblablement présentes après traitement de la glycoprotéine active par l'acide propionique M ou à pH acide.

D. — RÉSUMÉ

Le matériel gonadotrope purifié à partir de l'hypophyse de la Carpe est une glycoprotéine dont la composition a été déterminée. Son poids moléculaire est d'environ 27.000 et son point isoélectrique voisin de 5. Nous avons étudié l'effet de divers agents dissociants sur cette glycoprotéine (nrée, pH acide, acide propionique M) sur l'activité biologique et l'encombrement moléculaire. L'urée 8 M entraîne une perte importante de l'activité biologique sans dissociation de la molécule ou avec une dissociation facilement réversible. En présence d'acide propionique M ou à des pH de l'ordre de 2, l'activité biologique est très diminuée et il apparaît un matériel de poids moléculaire voisin de 16.000, ce qui suggère une dissociation de la protéine native. Enfin, nous avons étudié les caractéristiques biochimiques de la fraction (A) inactive dérivant de la glycoprotéine gonadotrope. Cette fraction apparaît similaire par son taux de sédimentation à la protéine dissociée. Sa composition en amino-acides n'est pas identique à celle de la glycoprotéine hormonale. Elle pourrait représenter une des sous-unités de la molécule native.

V. — COMPARAISON BIOCHIMIQUE ENTRE LES HORMONES GONADOTROPES LH ET FSH DE MAMMIFÈRES ET L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE

La glycoprotéine que nous avons purifiée manifeste, comme nous le verrons au chapitre suivant, toutes les caractéristiques de l'hormone gonadotrope de Carpe et sera désignée par l'abréviation c-GTH.

A. — COMPOSITION CHIMIQUE

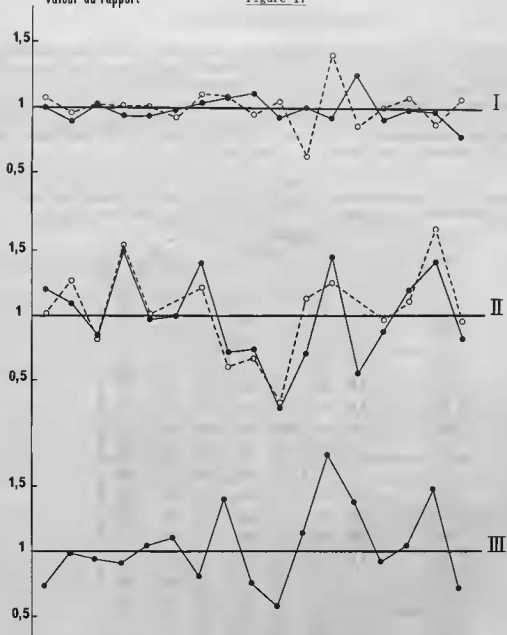
1. — Acides aminés

La comparaison de la composition globale en acides aminés est résumée dans la figure 17. Nous avons représenté ici le rapport des concentrations de chaque acide aminé pour divers couples d'hormones. La courbe qui est obtenue en joignant les différentes valeurs donne un profil des différences existantes. Avec les données bibliographiques concernant les LH ovine et bovine, une courbe témoin (courbe I) peut être tracée. En effet, nous observons que celle-ci est très voisine de la droite horizontale d'ordonnée égale à l'unité. Des différences pour la cystine et la valine sont cependant mises en évidence mais la valeur de la concentration de ces amino-acides peut être sous-estimée : la cystine est très fragile en milieu chlorhydrique 6 M et la valine nécessite des temps d'hydrolyse très longs pour être libérée totalement.

La courbe II représente les différences observées entre l'hormone gonadotrope de la Carpe et la LH de Bœuf ou de Mouton. Des différences importantes et qui intéressent de nombreux acides aminés sont mises en évidence. Elles ne peuvent être dues à des différences de conditions d'hydrolyse car elles concernent en particulier des acides aminés dont la destruction au cours de celle-ci est peu importante. Par contre, six amino-acides sont présents à une concentration très voisine : la lysine, la thréonine, la sérine, l'isoleucine, la leucine et la phénylalanine.

La même comparaison (courbe III) a été réalisée avec la α -FSH. Des différences existent également qui sont très importantes : la proline, la méthionine, la tyrosine et surtout la valine sont plus abondantes dans la c-GTH.

L'alanine et la phénylalanine sont par contre beaucoup moins abondantes dans l'hormone gonadotrope de la Carpe que dans la FSH ovine. Mais les concentrations de l'histidine, de l'arginine, de l'acide aspartique, de la thréonine, de la sérine, de l'isoleucine et de la leucine sont très voisines.



Lys His Arg Asp Thr Ser Glu Pro Gly Ala $\frac{1}{2}$ Cys Val Met Ile Leu Tyr Phe

Variation du rapport des concentrations de chaque amino acide des hormones LH et FSH des Mammifères et de ac-GTH.

- Courbe I ●—● c (A.A.) de o-LH selon Ward et al. (1969)
 c (A.A.) de o-LH selon de la Llosa et al. (1968)
 ○---○ c (A.A.) de b-LH selon Ward et al. (1969)
 c (A.A.) de b-LH selon Reichert et al. (1969)
- Courbe II ●—● c (A.A.) de c-GTH
 c (A.A.) de à-LH selon Ward et al. (1969)
 ○---○ c (A.A.) de c-GTH
 c (A.A.) de b-LH selon Reichert et al. (1969)
- Courbe III ●—● c (A.A.) de c-GTH
 c (A.A.) de o-FSH selon Papkoiff et al. (1970)

Dans l'hypothèse où la fraction (A) représenterait bien l'une des sous-unités de l'hormone native, une comparaison entre cette fraction (A) et la c-GTH et les sous-unités des hormones o-LH et o-FSH a été entreprise. Les données ont été rassemblées dans le tableau XI.

Aucune analogie n'apparaît, la composition de la fraction (A) est différente de celle des diverses sous-unités des hormones de Mammifères, il en est de même pour la différence entre les compositions de l'hormone gonadotrope de la Carpe et de la fraction (A). Cette différence pourrait correspondre à la composition de l'éventuelle seconde sous-unité.

TABLEAU XI

Comparaison de la composition en amino-acides (résidus pour 100 résidus analysés) des sous-unités des hormones o-LH et o-FSH avec la fraction inactive (A) et l'hormone gonadotrope de Carpe

Amino-acides R/100 R	o-LH*		o-FSH*		c-GTH		
	α	β	α	β	(A)	c-GTH	c-GTH - (A)
LYS	9,6	1,9	10,5	7,8	4,5	6,7	8,6
HIS	2,9	2,8	3,2	3,1	3,4	3,2	2,7
ARG	2,9	6,6	4,5	4,6	3,7	4,1	4,3
ASP	6,7	4,7	11,2	10,0	8,2	8,4	7,8
THR	9,6	4,7	6,2	9,5	8,6	1,7	6,1
SER	5,8	4,7	5,7	7,5	5,6	6,8	7,6
GLU	9,6	5,7	12,6	11,0	11,4	9,2	6,1
PRO	7,7	18,9	5,6	6,7	12,9	8,3	2,6
GLY	4,8	5,7	4,7	4,9	4,0	3,9	3,3
ALA	7,7	6,6	8,3	8,3	2,5	3,8	4,9
1/2 CYS	9,6	9,4	4,9	8,0	2,8	6,9	10,6
VAL	5,8	7,6	5,5	6,3	11,8	11,5	10,3
MET	3,9	1,9	0,3	0,3	0,8	1,5	2,2
ILE	1,9	3,8	2,7	3,6	2,6	2,8	2,8
LEU	1,9	11,3	9,0	4,8	8,1	7,4	6,1
TYR	4,8	0,9	2,7	3,8	3,0	4,8	6,3
PHE	4,8	2,8	4,2	3,8	1,5	2,8	3,8

* Selon Papkoff et Ekblad (1970).

2. — Glucides

La comparaison entre les parties glycaniques des différentes hormones gonadotropes mettent également en évidence des différences.

La concentration en hexoses et en hexosamines est différente à la fois de celle des deux hormones gonadotropes des Mammifères (BURZAWA-GÉRARD, 1969).

B. — CONSTANTES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous avons résumé dans le tableau XII les données qui concernent l'hormone gonadotrope de la Carpe ; elles ont été comparées à celles relevées dans la littérature pour la LH et la FSH de Mouton.

TABLEAU XII
 Constantes physico-chimiques de c-GTH et de la fraction (A)
 ainsi que celles concernant les hormones LH et FSH et leurs sous-unités

Constantes physico-chimiques	c-GTH	fraction (A)	α -LH*	α -LH	β -LH	α -FSH**	α -FSH	β -FSH
Taux de Sedimentation	2,5	1,8	2,42	1,51		-	-	-
Poids Moléculaire	29.000	15.800	29.000 à 30.000	14.000	14.000	28.000 à 30.000	15.000 à 17.000	
Coefficient d'exclusion	0,28	0,40	0,30	0,45	0,45	0,30	0,40 à 0,50	
Rayon de Stokes	31,3	24,0	30 ± 1	24 ± 1	24 ± 1	-	-	-
Point isoélectrique	5,1	4,4	7,3-7,7	-	-	4,5	-	-

* Selon Courie (1970).

** Selon Papkoff et Ekblad (1970).

L'analyse de ce tableau montre que nous sommes en présence d'une glycoprotéine de poids moléculaire et d'encombrement stérique très voisins de ceux qui caractérisent les glycoprotéines gonadotropes chez les Mammifères.

De même ces paramètres ont des valeurs voisines de celles de la fraction (A) et pour les sous-unités des hormones gonadotropes de Mammifères.

C. — EFFETS DES AGENTS DISSOCIANTS

L'urée 8 M dissocie la LH, la filtration sur Sephadex G 100 qui suit l'incubation dans l'urée donne un pic d'éluéon exclu pour $K_D = 0,45$ alors que celui de l'hormone native est de 0,30. Incubée dans l'urée puis filtrée sur Sephadex G 100, l'hormone gonadotrope de la Carpe ne présente pas la même caractéristique : 10 % des protéines forment un agrégat de poids moléculaire élevé, le reste des protéines est exclu sans variation du coefficient d'exclusion. Par contre, les expériences réalisées en milieu acide (tampon pH 2,2 [0,1 M] ou acide propionique M) ont montré que l'hormone gonadotrope de la Carpe manifestait le même comportement que la LH ou la FSH.

D. — CONCLUSION

Nous avons comparé les propriétés physico-chimiques et la composition des hormones gonadotropes LH et FSH de l'hypophyse des Mammifères avec celles de l'hormone gonadotrope de la Carpe. Ces hormones présentent de nombreuses analogies : ce sont toutes des glycoprotéines d'encombrement moléculaire voisin, elles possèdent toutes une structure quaternaire. Toutefois, elles sont différentes par leur composition en amino-acides et en sucres.

VI. — DISCUSSION

A. — PRÉPARATION

La méthode de purification que nous avons mise au point conduit à la séparation d'une fraction d'activité spécifique élevée (1,5 U en terme de LH-NIH-S 1) avec un rendement en protéines de 0,35 à 0,50 % et un rendement en activité de 15 à 30 %. La chromatographie sur DEAE-C est l'étape au cours de laquelle le rendement est le moins satisfaisant (50 à 70 % selon

les cas) : de plus, la séparation des activités thyroïdienne et gonadotrope est incomplète et nous conservons pour les étapes ultérieures une partie seulement des protéines possédant l'activité gonadotrope (35 à 40 % de l'activité initiale).

DONALDSON et YAMAZAKI (1968 a) purifient l'activité gonadotrope de l'hypophyse du Saumon *Oncorhynchus tshawytscha* par deux filtrations successives sur Sephadex G 100 et éventuellement une chromatographie sur DEAE.

SINHA (1969-1971) réalise une filtration sur Sephadex G 100 d'un extrait hypophysaire de Carpe. Il étudie l'activité biologique des trois fractions qu'il sépare en recherchant leur action sur la spermiation de la Carpe. Seule la fraction ff, retardée sur G 100, donne des réponses positives.

BRETON (1968) décrit la purification d'une fraction gonadotrope de Gardon à l'aide de la méthode appliquée par HERMIER (1965) pour la préparation d'une FSH de Mouton. L'activité biologique est étudiée à l'aide de différents tests de l'activité gonadotrope des Vertébrés inférieurs ; elle est retrouvée dans la fraction correspondant à la FSH de Mouton avec un rendement en activité très faible. BRETON obtient un résultat plus satisfaisant par une simple filtration sur Sephadex G 100 de la poudre hypophysaire brute de Gardon.

La comparaison des activités spécifiques des préparations obtenues par différents auteurs est difficile. En effet, les receveurs, les méthodes de dosage et les standards sont différents. YAMAZAKI et DONALDSON ont utilisé pour suivre la purification de l'hormone gonadotrope d'*Oncorhynchus*, le test de spermiation du Cyprin hypophysectomisé (YAMAZAKI et DONALDSON, 1968 a). L'hormone standard utilisée est l'hormone chorionique humaine : 10 UI donnent une réponse comparable à celle obtenue pour 3 µg de la préparation gonadotrope d'*Oncorhynchus*. L'activité spécifique est alors voisine de 3 UI HCG/µg. Nous avons essayé d'exprimer l'activité spécifique de notre préparation dans la même unité, en sachant que 1 µg LH-NH-S 1 donne la même réponse sur le test de spermiation de la Grenouille, que 1.25 UI HCG µg, la préparation d'*Oncorhynchus* apparaît alors légèrement plus active que celle de la Carpe. Cette comparaison est en fait très artificielle car il semble bien que les Amphibiens répondent beaucoup mieux que les Poissons Téléostéens aux hormones gonadotropes de Mammifères. Estimée en terme de HCG, une même préparation d'hypophyse de Poisson apparaîtra donc moins active si elle est dosée sur un Amphibien.

Les actions de c-GTH et de onc-GTH sur l'adényl-cyclase de l'ovaire de Cyprin ont été comparées : c-GTH apparaît 36 fois plus actif que onc-GTH. Cette valeur peut être surévaluée étant donné que le receveur est un Cyprinidé comme la Carpe (Y.-A. FONTAINE et al., 1972). Ces exemples montrent que la comparaison des activités spécifiques d'hormones d'espèces différentes est rendue difficile en raison des phénomènes de spécificité zoologique sur lesquels nous reviendrons.

B. — DEGRÉ DE PURETÉ ET STRUCTURE QUATERNAIRE

La préparation obtenue après électrophorèse préparative contient, d'une part des protéines biologiquement actives et, d'autre part une protéine inactive plus électro-négative. En ce qui concerne les premières, elles donnent en électrophorèse analytique une zone de Rf 0.50 à 0.54. Ceci pourrait être dû à la présence de plusieurs protéines différentes ayant des propriétés électrophorétiques voisines ; toutefois, l'ensemble de nos résultats (biochimiques et immunologiques en particulier) indique que ce fait traduit plutôt un microhétérogénéité à l'intérieur d'un seul type de molécule glycoprotéique. Une situation similaire a été mise en évidence dans le cas des différentes hormones glycoprotéiques des Mammifères : la TSH par exemple (PIERCE et al., 1958 ; CONDLIFFE et al., 1960), la LH (JUTISZ et SQUIRE, 1958 ; COURTE, 1970). Quant à la fraction (A) inactive, nos résultats indiquent qu'elle provient d'une transformation de la glycoprotéine native. Elle possède un poids moléculaire de 16.000 environ et ne manifeste sur le test de spermiation de la Grenouille aucune activité biologique. La dissociation de la c-GTH pourrait se produire

pendant l'électrophorèse : ORNSTEIN (1964) évoque cette possibilité sous l'influence de la différence de potentiel élevée qui existe au moment du passage dans le gel de concentration, une dissociation de certaines protéines enzymatiques ou hormonales peut se produire. LEWIS et al. (1968) ont montré que la prolactine et l'hormone de croissance donnaient par l'analyse sur gel de polyacrylamide des images similaires à celles observées pour la c-GTH. Cependant, nos résultats suggèrent qu'une dissociation limitée se produit aussi au cours des diverses autres manipulations et de même au cours de la conservation. BUTT et LYNCH (1972) observent pour la h-FSH des résultats similaires. Leur préparation de h-FSH présente toujours en proportions variables des molécules dissociées.

Les hormones glycoprotéiques de Mammifères possèdent une structure quaternaire. LIAO et PIERCE (1970) pour la b-TSH, PAPAHOFF et SAMY (1967) et de la LLOSA et al. (1967-1968) pour la o-LH, PAPAHOFF et ENBLAD (1970) pour la o-FSH ont dissocié et séparé les sous-unités de ces trois hormones glycoprotéiques.

La glycoprotéine de la Carpe possède également cette propriété de structure. L'acide propionique M. le pH acide dissocient la molécule : l'activité biologique est fortement diminuée et l'encombrement moléculaire devient celui d'une molécule de poids moléculaire d'environ 15.000. Cependant, les caractéristiques de réassociation semblent différentes de celles décrites pour les glycoprotéines mammaliennes et la restauration de l'activité biologique semble plus difficile.

L'identification des sous-unités de l'hormone gonadotrope de la Carpe reste encore imprécise. Nous avons émis l'hypothèse que l'une d'entre elles pourrait être représentée par la fraction (A). Néanmoins, des expériences complémentaires devront être faites pour vérifier cette hypothèse.

C. — COMPARAISON AVEC LES HORMONES LH ET FSH DES MAMMIFÈRES

L'hormone gonadotrope de la Carpe est, comme les hormones gonadotropes des Mammifères, une glycoprotéine. L'encombrement moléculaire est du même ordre et l'existence d'une structure quaternaire complète les points communs qui existent entre ces différentes hormones.

La composition en acides aminés comme en sucres et en sucres aminés distingue nettement ces différentes protéines. Aucune analogie n'a également été retrouvée en comparant les sous-unités de ces diverses hormones.

Insistons sur le fait que cette hormone d'un Poisson Téléostéen ne peut être associée plus spécialement, ni au groupe des hormones lutéinisantes, ni à celui des hormones folliculostimulantes des Mammifères. La détermination des séquences des acides aminés permettra sans doute, de mettre en évidence des tronçons communs et de démontrer l'existence, entre les hormones gonadotropes des différents Vertébrés, d'une homologie que certaines similitudes chimiques ainsi que des résultats indirects suggèrent, comme nous le verrons plus loin.

CHAPITRE II

CARACTERISATION BIOLOGIQUE DE L'HORMONE GONADOTROPE
DE LA CARPE
COMPARAISON AVEC LES HORMONES GONADOTROPES DES MAMMIFERES

I. — INTRODUCTION

La purification et la caractérisation chimique d'une glycoprotéine présente dans l'hypophyse de la Carpe et active sur la spermiation de la Grenouille ont été étudiées au cours du chapitre précédent. L'utilisation de ce seul test ne peut permettre l'identification de la nature hormonale et de la fonction gonadotrope de cette préparation.

Nous l'avons recherchée par l'étude de l'effet de cette glycoprotéine chez le Cyprin hypophysectomisé. Nous avons étudié, d'une part chez le mâle, la spermatogénèse et la spermiation et d'autre part chez la femelle, la vitellogénèse et l'ovulation. Un examen histologique a été réalisé sur la gonade des animaux.

De plus, nous étudierons l'action de la glycoprotéine sur divers paramètres biochimiques de l'activité gonadique chez le Cyprin ou l'Anguille. Ces études nous conduiront à conclure que la glycoprotéine purifiée est l'hormone gonadotrope de la Carpe (c-GTH).

L'utilisation au cours de la purification du seul test de spermiation de la Grenouille ne nous permet pas d'exclure l'existence d'une deuxième fraction inactive sur ce test mais qui aurait une action sur la gonade des Poissons. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié le rapport d'activité $\frac{\text{c-GTH}}{\text{hypophyse de Carpe}}$ sur différents tests de l'activité gonadotrope chez les Vertébrés inférieurs. Si ce rapport reste constant, on est conduit à conclure qu'il n'y a pas dans l'hypophyse d'autre substance gonadotrope que celle que nous avons purifiée.

Dans une troisième partie, nous chercherons à comparer les caractéristiques biologiques des hormones gonadotropes des Vertébrés supérieurs et celle de l'hormone gonadotrope de la Carpe. Nous étudierons, d'une part l'action de nos préparations par les tests classiques utilisés pour le dosage des FSH et des LH de Mammifères (STEELMAN et POHLEY, 1953 ; PARLOW, 1961) et d'autre part l'action des hormones LH et FSH par les tests de l'activité gonadotrope utilisant des Vertébrés inférieurs comme receveurs.

II. — ACTION DE LA c-GTH SUR LA GONADE DE POISSONS TELEOSTEENS :
NATURE HORMONALE DE c-GTH

L'activité hormonale se caractérise essentiellement par la réponse de l'effecteur. De plus, SUTHERLAND et al. (1968) ont précisé l'intermédiaire par lequel certaines hormones agissent sur les cellules effectrices. Chez les Mammifères, les hormones gonadotropes en particulier exercent au moins une partie de leur action en stimulant une adényl-cyclase (MARSH, 1970 ; KUELH et al., 1970 ; FONTAINE et al., 1971 ; KOLENA et CHANNING, 1972).

A. — RÉGÉNÉRATION DE LA GONADE DU CYPRIN HYPHYPHISECTOMISÉ

Les Cyprins sont hypophysectomisés par voie operculaire selon CHAVIN (1956) et sont gardés à 20 °C pendant un mois avant tout traitement hormonal. Dans ces conditions, les gonades sont complètement régressées, seules subsistent les ovogonies ou les spermatogonies souches ; d'éventuels spermatozoïdes résiduels non éjaculés ont eux-mêmes complètement disparu. Chez les femelles, les ovocytes primaires représentent la forme la plus évoluée et aucune amorce de vitellogénèse ne peut être observée. Ces résultats (BULLARD et al., 1970) sont en accord avec ceux précédemment décrits (YAMAZAKI, 1965). Les Poissons reçoivent alors par voie intra-péritonéale trois injections par semaine de la solution hormonale (0,1-1,5 µg/g de poids et par injection) de la préparation BG 2-67 (type IV) ou d'un extrait hypophysaire brut d'hypophyses de Carpe (5 µg/g de poids et par injection). Les animaux témoins, hypophysectomisés ou non, reçoivent des injections de sérum physiologique. Les Poissons ont été sacrifiés en moyenne entre les 50^e et 70^e jours après le commencement des injections.

1. — Résultats obtenus sur la gonade mâle

Après 41 jours de traitement, les animaux mâles recevant la forte dose d'hormone sont capable d'émettre du sperme après légère pression de l'abdomen alors que les animaux témoins hypophysectomisés et non hypophysectomisés ne peuvent le faire. Ce résultat indique que la c-GTH exerce son action sur la spermatogénèse et sur la spermiation. Ce premier point est confirmé par la mesure du RGS et par l'examen histologique.

a) Le RGS, qui est égal à 0,9 chez les animaux témoins hypophysectomisés, passe à 2 chez les animaux hypophysectomisés traités par la c-GTH.

b) L'histologie a permis l'obtention de données quantitatives plus précises. Le nombre de cellules de la lignée spermatogénétique par unité de volume a été déterminé au moyen d'un oculaire intégrateur. L'histologie du testicule des Poissons hypophysectomisés confirme la dégénérescence de la gonade ; seules subsistent les spermatogonies et les cellules de Sertoli, la lumière des tubules reste cependant individualisée.

Les effets de la c-GTH sur l'aspect histologique du testicule sont représentés graphiquement figure 18. La spermatogénèse est fortement stimulée : les spermatogonies B en particulier, les spermatoocytes, les spermatides et les spermatozoïdes augmentent de façon spectaculaire par rapport aux mêmes cellules chez les animaux témoins hypophysectomisés. La dose la plus efficace est celle de 1 µg/g. Les phénomènes de picnose sont beaucoup plus élevés chez les Poissons qui reçoivent la forte dose, en conséquence la production en spermatozoïdes se trouve diminuée.

Les effets de l'extrait salin hypophysaire de Carpe ont été également étudiés ; la spermatogénèse des Poissons hypophysectomisés recevant l'équivalent de 5 µg d'hypophyses de Carpe par injection et par gramme de poids corporel est restaurée. Le nombre de cellules comptées, par unité de volume, de chaque espèce cellulaire de la lignée spermatogénétique, est très voisin de celui des animaux témoins non hypophysectomisés (il est aussi légèrement inférieur à celui des animaux qui reçoivent 0,1 µg de la c-GTH/g et par injection). Dans ce lot également, le nombre de cellules picnotiques est plus élevé que dans le lot des témoins non hypophysectomisés.

2. — Résultats obtenus sur la gonade femelle

L'expérimentation sur les Poissons femelles a été poursuivie parallèlement à celle sur les mâles et dans les mêmes conditions expérimentales. Les animaux sont sacrifiés après un traitement de durée variable (20 à 70 jours). Les effets de l'hormone purifiée sont résumés dans le tableau XIII.

a) Après hypophysectomie, le RGS diminue, il passe de 4 environ à des valeurs de l'ordre de 2. Après traitement à la c-GTH, l'augmentation du RGS n'est pas très élevée : les Poissons qui reçoivent 0,1 µg de c-GTH/g de poids et par injection ont un RGS d'environ 3 : ceux qui reçoivent une dose dix fois plus élevée retrouvent en moyenne le RGS qu'ils possédaient

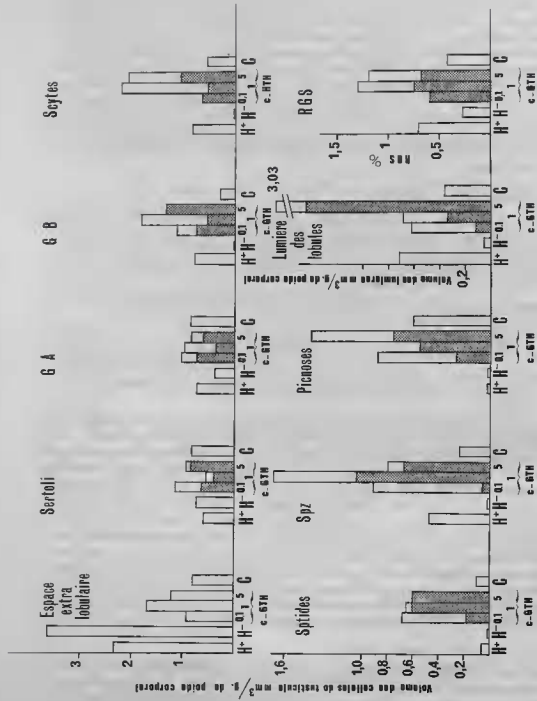


Figure 18

Regénération de la gonade du Cyprin hypophysectomisé par l'hormone Gonadotrope de la Carpe c-GTH préparation BG 2-67 (type IV) et par un extrait brut d'hypophysés de Carpe.

H⁺ témoin non hypophysectomisé
 H⁻ témoin hypophysectomisé
 c-GTH hormone gonadotrope de Carpe (µg/E/injection)
 C extrait hypophysaire de Carpe 5 µg/E/injection.

les valeurs indiquées en abscisse correspondent aux volumes occupés par les différentes cellules présentes dans le testicule :

- espaces intraobulaires (cellules interstitielles et conjonctif en dehors des lobules)
- Cellules de Sertoli
- G4 et GB
- Spermatozoïdes A et B
- Spermatozoïdes I et II
- Sptide
- Spz
- Pichnose
- Cellules picnotiques dans les lobules
- lumière des lobules partie de la lumière des lobules non occupée par les spermatozoïdes
- RGS
- Rapport gonadosomatique (%)

la partie pointillée correspond à la valeur trouvée pour des animaux sacrifiés après 35 jours de traitement

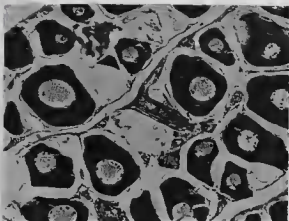


Figure 19

Ovaire de Cyprin hypophysectomisé témoin.
Coloration hémalin éosine G $\times 80$.

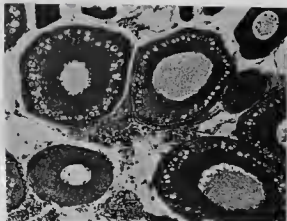


Figure 20

Ovaire de Cyprin hypophysectomisé recevant $0.1\mu\text{g/g}$ injection de la préparation BG2-67 (type IV).
Coloration hémalin éosine C $\times 80$.

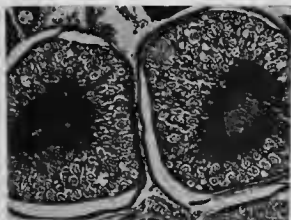


Figure 21

Ovaire de Cyprin hypophysectomisé recevant $5\mu\text{g/g}$ injection de la préparation BC2-67 (type IV).
Coloration hémalin éosine G $\times 80$.

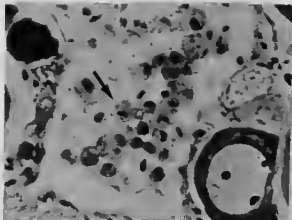


Figure 22

Ovaire de Cyprin hypophysectomisé recevant $5\mu\text{g/g}$ injection de la préparation BG2-67 (type IV). Ovogonie en cours de multiplication.
C $\times 360$ Col. hémalin éosine.



Figure 23

Ovaire de Cyprin hypophysectomisé recevant $5\mu\text{g/g}$ injection de la préparation BC2-67 (type IV).
Cellules folliculaires et de la thèque.
C $\times 360$ Col. hémalin éosine.



avant l'hypophysectomie. Une très forte augmentation est observée, pour un Poisson, dont le RGS passe à 11. Cet animal avait reçu pendant 70 jours des doses d'hormone plus importantes, soit 5 $\mu\text{g/g}$ de poids et par injection. Notons que la valeur maximale du RGS observée chez les Cyprins vivants dans la nature est, selon YAMAZAKI (1965), de l'ordre 12.

b) L'étude histologique des ovaires a permis d'obtenir des résultats plus intéressants. Les Poissons témoins hypophysectomisés présentent un ovaire analogue à celui décrit pour les Poissons immatures : les ovocytes ont un diamètre de 75 à 140 μ ; ils se maintiennent aux caractéristiques décrites pour la première phase de croissance (YAMAZAKI, 1965). Aucune trace de vitellus ne peut être observée (fig. 19).

Les Poissons qui reçoivent 0,1 μg de c-GTH g de poids présentent un ovaire différent : le diamètre de l'ovocyte est augmenté, il passe de 110 à 239 μ . Un anneau de vitellus est visible pour de nombreux ovocytes (fig. 20).

TABLEAU XIII

Régénération de la vitellogénèse chez le *Cyprin hypophysectomisé* traité à l'hormone gonadotrope de la Carpe (BG 2-116 type IV)

Dose c-GTH ($\mu\text{g/g}$ /injection)	Quantité d'hormone reçue (μg)	RGS	Diamètre des ovocytes (μ)	Vitellogénèse
Temoin	au debut	0	75 à 140	0
	a la fin	0		
0,1	0.8	3,3	110 à 230	1 anneau de vitellus
	1.	2,7		
	1.8	2,6		
1	20	2,8	100 à 310	plusieurs anneaux de vitellus
	21	4,7		
	24	3,9		
5	45	2,4	300 à 690	vitellogénèse complète
	150	10,9		

* Ce Poisson a été sacrifié après 20 jours de traitement alors que les autres ont été sacrifiés entre le 50^e et le 70^e jour.

Les Poissons qui reçoivent les doses supérieures de 1 et 5 $\mu\text{g/g}$ de c-GTH présentent une vitellogénèse beaucoup plus avancée. Le diamètre des ovocytes passe de 300 à 700 μ et des vésicules de vitellus en anneaux concentriques sont observées à la périphérie du cytoplasme (fig. 21).

L'étude histologique de l'ovaire du Poisson dont l'élévation de la valeur du RGS est la plus importante permet d'apporter certains éléments complémentaires : la stimulation de la vitellogénèse apparaît très élevée et un grand nombre d'œufs sont proches de la maturité. Cependant, un grand nombre d'œufs sont beaucoup moins développés, leur diamètre est de 500 μ en moyenne,

la zona radiata commence à s'épaissir et à être colorée en rouge par l'éosine. Des corps atrétiques sont également observés. Certains d'entre eux présentent un phénomène curieux, une reprise de la vitellogénèse.

Une deuxième observation doit être signalée, les ovogonies paraissent être également le siège d'une stimulation, nous avons pu observer (fig. 22) deux ovogonies en cours de multiplication comme le témoigne la concentration des chromosomes à la plaque équatoriale au cours de la prophase méiotique.

Le troisième point observé sur ces coupes est la stimulation des cellules folliculaires (fig. 23) qui entourent l'ovocyte et la zona radiata. Ces cellules sécrètent les stéroïdes sexuels (LAMBERT, 1968).

L'effet de l'extrait brut d'hypophyses de Carpe a ici également été étudié. L'injection de l'équivalent de 5 μg d'hypophyses de Carpe induit aussi une forte stimulation de la vitellogénèse. Le diamètre des ovocytes est de 300 à 400 μ . Plusieurs anneaux de vitellus et des vésicules vitellines sont présents dans le cytoplasme.

B. — ACTION DE LA c-GTH SUR DIVERS PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES DE L'ACTIVITÉ GONADIQUE

1. — Chez l'Anguille

La fixation du phosphore ^{32}P sous forme de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ par le testicule de l'Anguille mâle est augmentée sous l'influence des préparations G 52 et BG 121 (types I et III) : les réponses observées sont significatives. Par exemple, pour la préparation G 52 (type I), le test d'hétérogénéité conduit à une probabilité $p < 0,05$ avec $F = 4,9$, $n_1 = 1$, $n_2 = 20$ (fig. 24 A).

2. — Chez le Cyprin

De même la teneur en eau du testicule du Cyprin est augmentée proportionnellement avec le logarithme de la dose injectée (préparation G 52, type I). La corrélation est significative ($Y = 7,5 X + 73,3$, $r = 0,97$, $dl = 4 \mu < 0,01$) (fig. 24 B).

Nous avons aussi recherché l'action de la c-GTH sur l'adényl-cyclase de l'ovaire (Y.-A. FONTAINE et al., 1970).

Des homogénats d'ovaires entiers de Cyprin sont incubés avec des doses croissantes de la préparation gonadotrope et l'activité adényl-cyclasique est déterminée en mesurant le α ^{32}P -AMP_c formé à partir du α ^{32}P -ATP marqué, placé dans le milieu d'incubation (KRISHNA et al., 1968). Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 25. L'AMP_c formé augmente avec le logarithme de la dose d'hormone placée dans le milieu d'incubation. Ces résultats ont été obtenus sur des ovaires en début de vitellogénèse. Le diamètre moyen des ovocytes est alors de 60 à 200 μ . le RGS est faible (2,5 % en moyenne).

C. — DISCUSSION ET RÉSUMÉ

Les différentes préparations purifiées à partir de la poudre acétonique d'hypophyses de Carpe en suivant l'activité au moyen du test de spermiation de la Grenouille se révèlent posséder toutes les caractéristiques définissant une hormone gonadotrope (c-GTH, hormone gonadotrope de la Carpe). Elle agit en effet sur la spermatogénèse et sur l'ovogénèse chez le Cyprin hypophysectomisé. Elle intervient au moment de la spermiation et vraisemblablement de l'ovulation. En effet, BRETON et al. (1927) ont montré par dosage immunologique une augmentation (5 à 10 fois) du taux plasmatique d'une substance immunologiquement similaire à la c-GTH au moment de l'ovulation.

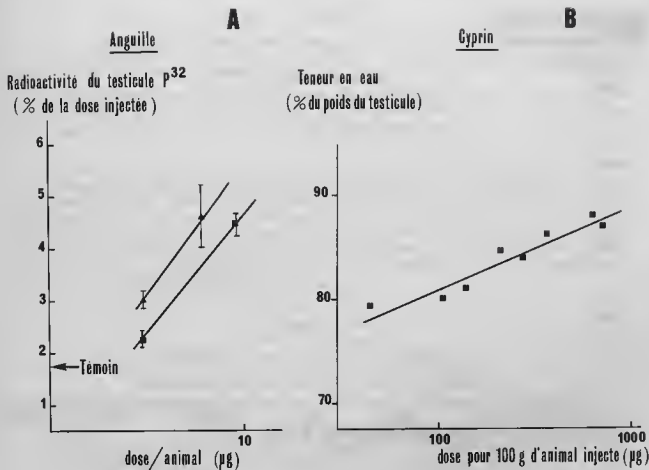


Figure 2*

- A- fixation du ^{32}P par le testicule de l'anguille en fonction de la dose d'hormone gonadotrope injectée.
 préparation G52 (type I)
 préparation BG 121 (type III)
 Moyenne \bar{Y} \pm erreur type de la moyenne
- B- variation de la teneur en eau des testicules du cyprin en fonction de la dose d'hormone reçue.
 préparation G52 (type I)

Augmentation de la quantité
d'AMPc formée, en p.cent
des témoins

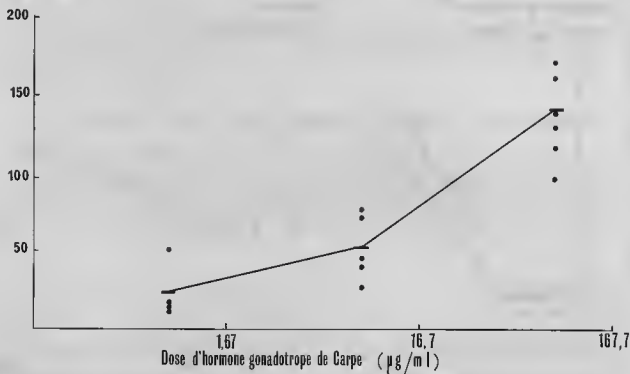


Figure 25

Stimulation de la formation d'AMP par des homogénats d'ovaires de cyprin (résultats cumulés de quatre expériences) sous l'influence de l'hormone gonadotrope de Carpe (BG 2-S type IV) chaque point correspond à un tube d'incubation et les tirets aux moyennes.

Milieu d'incubation

Tris HCl 29. 10^{-3} M pH 7,4
Phosphoenolpyruvate 7,2 10^{-3} M
Pyruvate kinase 12 unités/ml
ATP- 32 P 1,33. 10^{-3} M
Albumine 167 µg/ml
Magnésium (Mg^{++}) 4,3. 10^{-3} M
Théophylline 9. 10^{-3} M
Saccharose 0,1 M
Protéines ovariennes environ 1,07 mg/ml

Durée d'incubation 15 mn
Température d'incubation 20°C

III. — ETUDE DU RAPPORT D'ACTIVITE $\frac{c\text{-GTH}}{\text{HYPOPHYSE DE CARPE}}$:
UNICITE DE L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE

A. — RÉSULTATS

L'activité biologique de l'hormone gonadotrope a été déterminée au moyen de différents tests. Pour chacun d'eux, le rapport $\frac{c\text{-GTH}}{\text{hypophyse de Carpe}}$ a été déterminé. On peut penser que si une autre hormone gonadotrope était présente dans l'extrait hypophysaire brut de la Carpe, la valeur du rapport serait variable. En effet, chez les Mammifères, où il existe deux hormones gonadotropes, on observe que les différents tests ne possèdent pas la même sensibilité aux LH et FSH.

Le tableau XIV résume les résultats obtenus. Lorsque pour chaque préparation nous comparons le rapport déterminé par la spermiation de la Grenouille avec celui déterminé sur un autre test, aucune différence significative n'est observée. Seule la détermination par le dosage radio-immunologique ne conduit pas au même résultat : la valeur du rapport semble inférieure à celle déterminée par le test de spermiation de la Grenouille. Cette différence peut être due à l'existence d'impuretés protéiques fortement antigéniques dans la c-GTH : la présence de faibles quantités de TSH en particulier ne peut être exclue. La réponse de l'extrait hypophysaire de Carpe serait alors déterminée par excès.

TABLEAU XIV

Etude du rapport d'activité $\frac{c\text{-GTH}}{\text{hypophyse de Carpe}}$
sur différents receveurs Poissons Téléostéens et Amphibiens

REFERENCES	ESPECES	TEST	$\frac{G-52}{\text{Hyp. Carpe}}$	$\frac{RG2-67}{\text{Hyp. Carpe}}$	$\frac{RG2-116}{\text{Hyp. Carpe}}$
Burzawa - Gerard et Y. A. Fontaine (1965)	Anguille	fixation de ^{32}P par le testicule	11,6 (4,4-30,3)		
Y. A. Fontaine et al. (1970)	Cyprin	adenyl-cyclase de l'ovaire		20	
Burzawa - Gerard et Y. A. Fontaine (1965)	Rana esculenta	Spermiation	6,8 (4,3-10,7)	15 (10-22)	12,5 (9,2-16,7)
Hobson et Barr 1966	Rana pipiens	Spermiation	6,6		
i d e m	Xenopus laevis	Spermiation	11,2		
Burzawa - Gerard et Y. A. Fontaine (1965)	Alytes obstetri- cans	Gonflement des testicules	7,4 (0,23-41,7)		
Breton et al. (données inédites)		Radioimmunologie			6,1

B. — DISCUSSION

Dès 1965, nous avons émis l'hypothèse qu'une unique hormone gonadotrope pouvait être présente dans l'hypophyse de la Carpe (E. BURZAWA-GÉRAUD et Y.-A. FONTAINE, 1965). D'une part, l'étude biochimique de l'hypophyse de la Carpe met en évidence la présence d'une seule fraction gonadotrope (c-GTH) et d'autre part la détermination du rapport d'activité $\frac{\text{c-GTH}}{\text{hypophyse de Carpe}}$ par divers tests de l'activité gonadotrope des Vertébrés inférieurs montre que celui-ci reste statistiquement constant. La c-GTH manifeste tous les types d'activité exercés par l'extrait hypophysaire brut.

L'étude de la régénération de la gonade du Poisson hypophysectomisé que nous avons décrite précédemment a complété ces résultats et permis de montrer que la même glycoprotéine pouvait restaurer la spermiation et la spermatogénèse chez le mâle et la vitellogénèse en particulier chez la femelle.

Cependant, les rendements de la spermatogénèse et de la vitellogénèse ne sont pas aussi élevés que chez les animaux « sauvages ». L'existence des phénomènes de picnose ne peut être négligée : ils constituent un facteur limitant. L'excès d'hormone au moment des injections peut être un facteur qui favorise la picnose des cellules, la concentration de l'hormone circulante étant beaucoup plus faible que celle des solutions hormonales injectées. De plus, l'hypophysectomie entraîne un manque de toutes les stimulines et une bonne partie du fonctionnement endocrinien du Poisson se trouve perturbée, en particulier par le défaut des hormones. Cependant, l'injection d'extrait hypophysaire brut n'est pas non plus totalement satisfaisant mais il est possible que les proportions des diverses hormones dans l'extrait acétonique d'hypophyses de Carpe ne soient pas adéquates pour une normalisation totale du fonctionnement de la gonade du Cyprin. Enfin, les conditions de lumière et de température dans lesquelles les expériences ont été réalisées peuvent ne pas être optimales pour la maturation sexuelle du Cyprin : nous avons en effet observé que les Poissons non hypophysectomisés, placés dans ces conditions, ont un RGS plus faible que ceux gardés dans des conditions naturelles.

Notons enfin qu'une action de la c-GTH sur la sécrétion des stéroïdes sexuels par les cellules folliculaires est suggérée par le fait que cette hormone stimule la vitellogénèse.

C. — RÉSUMÉ ET CONCLUSION

L'hormone gonadotrope (c-GTH) de la Carpe possède toutes les activités gonadotropes présentes dans l'hypophyse de la Carpe. Elle est capable en effet de restaurer, à elle seule, la spermatogénèse et la vitellogénèse du Poisson hypophysectomisé. Elle permet la spermiation du mâle et elle intervient au moment de l'ovulation chez la femelle. De plus, le rapport $\frac{\text{c-GTH}}{\text{hypophyse de Carpe}}$ déterminé sur les divers tests de l'activité gonadotrope des Vertébrés inférieurs reste constant. Tous ces résultats conduisent à penser que la glycoprotéine, stimulant les gonades, que nous avons purifiée à partir d'hypophyses de Carpe, est la seule hormone gonadotrope présente dans ce matériel.

IV. — COMPARAISON SUR DIFFÉRENTS RECEVEURS DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE AVEC CELLES DES LH ET FSH DE MAMMIFÈRES

A. — RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES HORMONES GONADOTROPES DE MAMMIFÈRES SUR LES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

Nous avons recherché l'action de la LH et de la FSH sur les différents tests appliqués précédemment à l'étude de l'activité gonadotrope de l'hypophyse de la Carpe.

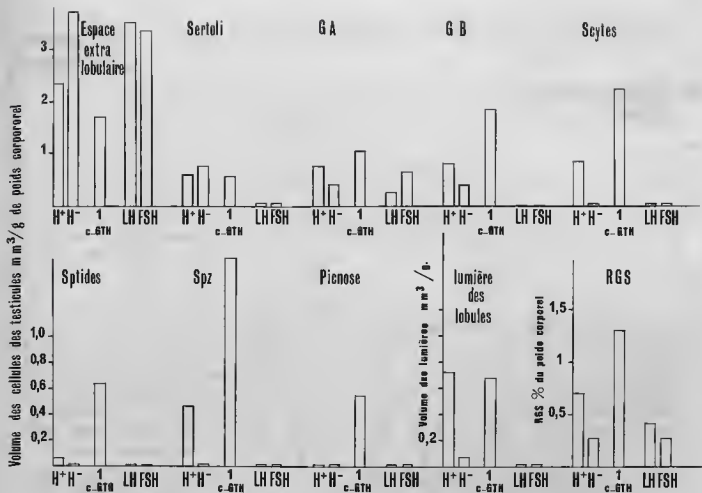


Figure 26

Comparaison de l'action des hormones LH et FSH des Mammifères et de la c-GTH sur la régénération de la gonade du cyprin hypophysectomisé.

Les valeurs indiquées en abscisse correspondent aux volumes occupés par les différentes cellules présentes dans les testicules :

- espaces intralobulaires (cellules interstitielles et conjonctif en dehors des lobules)
- Sertoli Cellules de Sertoli
- GA et GB Spermatogones A et B
- Sptide Spermatides
- Scyts Spermatocytes I et II
- Spz Spermatozoïdes
- Picnose Cellules picnotiques dans les lobules
- lumière des lobules partie de la lumière des lobules non occupée par les spermatozoïdes
- RGS Rapport gonado-somatique

H⁺ témoin non hypophysectomisé
 H⁻ témoin hypophysectomisé
 c-GTH hormone gonadotrope de Carpe (1 µg/g/injection)
 LR-M₃ hormone lutéinisante de Mouton (CNRS) (10 µg/g/injection)
 FSH-M₂ hormone folliculostimulante de Mouton (CNRS) (10 µg/g/injection)

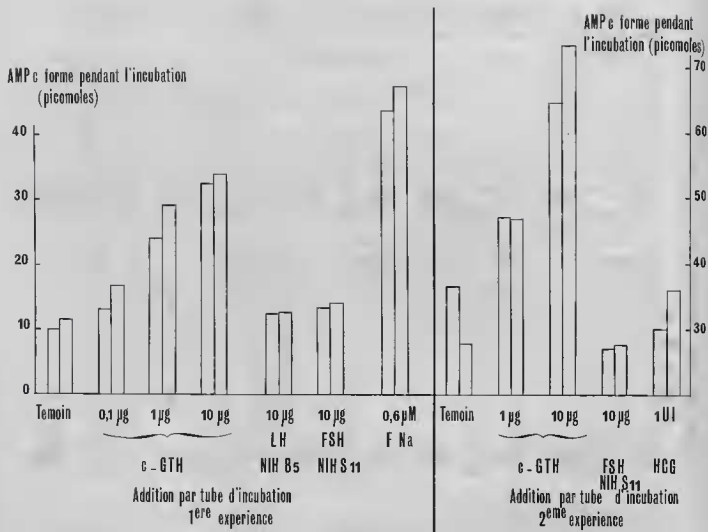


Figure 27

Comparaison de l'activité de la c-GTH, la o-LH, la o-FSH et la HCG sur l'adenyl-cyclase de l'ovaire de Cyprin

Milieu d'incubation	Tris-HCl $29.10^{-3}M$ pH 7,4	Phosphoénolpyruvate $7,2.10^{-3}M$
	Pyruvate kinase 12 unités/ml	ATP- ^{32}P $1,33.10^{-3}M$ 30 cpm/p Mole
	Albumine 167 µg/ml	Magnésium (Mg^{++}) $4,3.10^{-3}M$
	Théophylline $9.10^{-3}M$	Saccharose 0,1M
	Protéines ovariennes 0,5mg/ml	

Durée d'incubation 15 mn

Température d'incubation 20°C

1. — *Anguille*

L'influence éventuelle des hormones gonadotropes des Mammifères a été recherchée sur la fixation du phosphore ^{32}P par le testicule de l'Anguille.

a) LH (LH-NIH-S 11)

La fixation du phosphore n'est pas augmentée, quelle que soit la dose injectée (10, 100 ou 1.000 μg /animal). Le calcul statistique réalisé sur l'ensemble des animaux (témoins et traités) conduit à l'homogénéité de l'ensemble considéré ($F = 1,90$, $dl_1 = 3$, $dl_2 = 18$, $0,05 < p < 0,2$).

b) FSH (FSH-NIH-S 3)

50, 300 ou 2.000 μg de la préparation hormonale ont été injectés aux Anguilles. L'ensemble des données traitées statistiquement (test d'homogénéité $F = 1,10$, $dl_1 = 3$, $dl_2 = 20$, $p < 0,20$) nous permet de conclure à l'absence de réaction.

L'hormone gonadotrope de la Carpe, comme nous l'avons vu (cf. fig. 24 A), donne une réponse statistiquement différente de celle des témoins à partir d'une dose seuil de 2 μg de la préparation BG 121 (type III).

2. — *Cyprin*

a) Régénération de la gonade du Cyprin hypophysectomisé

Nous avons recherché l'éventuelle régénération de la gonade mâle de Cyprin hypophysectomisé sous l'influence des préparations hormonales LH-M₂ (C.N.R.S.) et FSH-M₂ (C.N.R.S.) (BILLARD et al., 1970). Ces hormones n'ont aucune action. La spermatogénèse n'est pas restaurée, la structure du testicule est plus dégradée que sur les animaux hypophysectomisés : il est impossible d'individualiser les lobules et d'identifier les cellules de Sertoli. Comme chez les animaux témoins hypophysectomisés, l'importance du conjonctif extra-lobulaire est responsable des valeurs relativement élevées du RCS. Nous avons résumé l'ensemble des résultats sur la figure 26.

b) Mesure de l'activité adényl-cyclasique de l'ovaire en prévitellogénèse

Aucune des hormones gonadotropes hypophysaires des Mammifères (LH et FSH) n'est capable de stimuler l'adényl-cyclase à des concentrations même 100 fois plus élevées que celles utilisées pour la c-GTH (FONTAINE et al., 1970). L'hormone chorionique humaine HCG-1 U1 tube d'incubation) ne stimule pas non plus l'adényl-cyclase de l'ovaire de Cyprin. L'ensemble des résultats est résumé dans la figure 27.

3. — *Amphibiens*

Rappelons que les extraits hypophysaires de Poisson sont capables d'induire la spermiation de la Grenouille *Rana esculenta* (FONTAINE et CHAUVEL, 1961). BARR et HOBSON (1964) l'observent également chez *Xenopus laevis*.

Les hormones gonadotropes LH et FSH ainsi que la HCG induisent également la spermiation de la Grenouille (tableau XV). La LH a ici été utilisée dans certains cas comme hormone de référence pour exprimer l'activité des différentes préparations de la c-GTH. Cependant, comme nous l'avons décrit dans « Matériel et Méthodes », la sensibilité relative de la gonade de la Grenouille à la LH est variable au cours de l'année.

Le test de gonflement des testicules du Têtard d'*Alytes obstetricans* (DELSOL et FLATIN, 1961) a été également utilisé. LERAY (1963) observe une réponse positive avec un extrait brut d'hypophysés de Carpe. Les hormones LH et FSH de Mammifères comme la c-GTH donnent des réponses positives (DELSOL et al., 1970). L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau XV.

Les hormones gonadotropes LH et FSH n'agissent pas sur ces deux receveurs avec la même efficacité relative. La FSH apparaît plus active chez le Têtard d'*Alytes* que chez la Grenouille

(BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1965). Le rapport d'activité $\frac{\text{FSH-NIH}}{\text{LH-NIH}}$ a été déterminé chez d'autres Amphibiens et Reptiles par différents auteurs (cf. BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1972) et il varie de façon importante.

TABLEAU XV

Détermination de la dose moyenne effective sur des tests utilisant un Amphibien comme receveur des hormones gonadotropes (LH et FSH) des Mammifères et de l'hormone gonadotrope de la Carpe (c-GTH)

Test	D 50 ($\mu\text{g}/\text{animal}$)		
	LH NIH - S1	FSH NIH S1	c - GTH
Spermiation de la Grenouille <i>Rana esculenta</i>	2,6 (1,9 - 3,5)	31,2 (25,6 - 38,0)	8,0 (6,4 - 9,9)
Gonflement du testicule du têtard <i>Alytes obstetricans</i>	0,2 (0,1 - 0,3)	0,5 (0,3 - 0,8)	1,6 (0,9 - 2,6)

La gonade des Amphibiens, comme celle des Reptiles, possède donc l'intéressante propriété d'être sensible non seulement à leur propre hormone, mais aussi aux hormones gonadotropes des Mammifères et des Poissons. L'activité relative de ces différentes hormones n'est généralement pas la même, selon l'animal choisi, et aussi selon certaines conditions extérieures.

B. — RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE L'HORMONE GONADOTROPE DE LA CARPE SUR LE RAT

1. — Déplétion de l'acide ascorbique de l'ovaire chez la Ratte pseudogestante

Ce test (PARLOW, 1967) a été appliqué dans les conditions décrites par PELLETIER (1963) : 100 et 500 μg de c-GTH (BG 2-67, type IV) n'ont aucune action tandis qu'une régression significative avec des doses faibles de LH (LH-NIH-B 5) est observée.

Les résultats sont représentés sur la figure 28 (test d'homogénéité $F = 4,8$, $n = 1-9$, $0,05 < p < 0,20$).

2. — Augmentation de poids de l'ovaire de la Ratte prépubère traité par le HCG

Ce test a été appliqué dans les conditions décrites par STEELMAN et POHLEY (1953) et en présence de 20 UI de HCG.

Différentes préparations de c-GTH ont été utilisées pour ce travail. 200 μg de G 52 ne possèdent aucune activité sur ce test (BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1965). Il en est de même avec des doses beaucoup plus élevées de préparations plus purifiées. Les résultats sont résumés dans la figure 29. Le traitement statistique des données expérimentales (test d'homogénéité $F = 2,6$, $dl = 1-9$, $p > 0,05$) nous permet de conclure à l'homogénéité des lots d'animaux témoins et de ceux ayant reçu l'hormone gonadotrope de la Carpe.

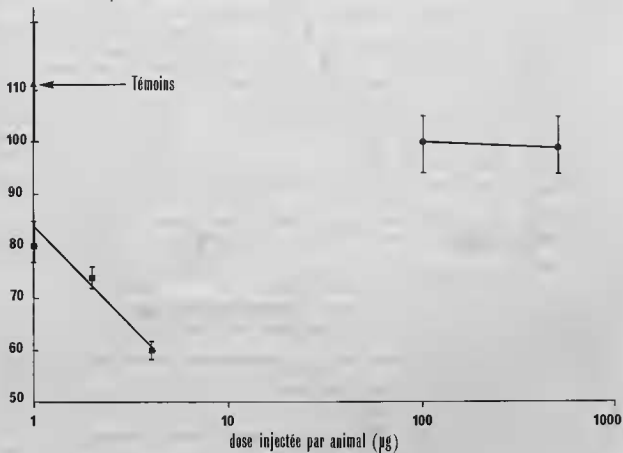
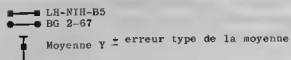
Acide ascorbique ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ d'ovaire)

Figure 28

Inactivité de la c-GTH sur la concentration de l'acide ascorbique de l'ovaire de Ratte pseudo-gestante



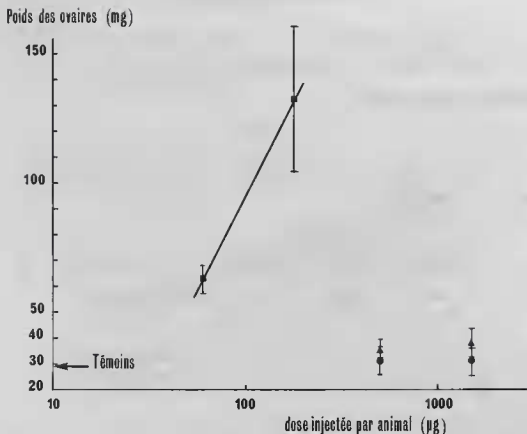


Figure 29

Inactivité de la c-GTH sur le poids de l'ovaire de Ratte prépubère traitée par la HCG.

- FSH-NIH-S11
- ▲ BG 32 B
- BG 19
- Moyenne \bar{Y} \pm erreur type de la moyenne

V. — DISCUSSION

A. — NATURE HORMONALE

La méthode préparative que nous avons étudiée au cours du chapitre précédent nous a permis d'obtenir une glycoprotéine d'un degré de pureté élevé possédant une action gonadotrope.

Cette action est clairement définie par les expériences de régénération réalisées sur le Cyprin hypophysectomisé. Chez le mâle, la spermatogénèse est restaurée jusqu'à émission du sperme, chez les femelles, la vitellogénèse est reprise et elle se poursuit complètement. De plus, l'élaboration du vitellus dans les ovocytes, d'une part et d'autre part la stimulation des cellules folliculaires que nous observons constituent une preuve indirecte de la sécrétion accrue des stéroïdes sous l'influence de la c-GTH. Par ailleurs, YAMAZAKI et DONALDSON (1969), avec une préparation gonadotrope provenant d'un autre Poisson Téléostéen (*Oncorhynchus tshawytscha*) mais possédant des caractères biochimiques très voisins de la c-GTH (DONALDSON et al., 1972), observent que l'onc-GTH stimule la 3β hydroxystéroïdehydrogénase du testicule du Cyprin hypophysectomisé, suggérant ainsi qu'une stimulation de la stéroïdogénèse a lieu sous l'influence de cette hormone.

Enfin, la présence de la e-GTH dans l'hypophyse, surtout dans la pars distalis proximale, a été vérifiée par immunofluorescence (BILLARD et al., 1970). Cette même glycoprotéine, ou du moins une substance ayant les mêmes propriétés antigéniques, est présente dans le sang du Cyprin. Les dosages radio-immunologiques du plasma du Cyprin mettent en évidence un rythme nyctéméral du taux plasmatique et une élévation de ce taux au moment de l'ovulation (BRETUS et al., 1972).

Nos préparations agissent également sur divers paramètres biochimiques de l'activité gonadique des Poissons Téléostéens.

a) L'activation de l'adényl-cyclase suggère que l'hormone gonadotrope de la Carpe agit par l'intermédiaire de l'AMP_c pour au moins une partie de ses activités sur la gonade.

b) La fixation du phosphore radio-actif par le testicule de l'Anguille est augmentée sous l'influence de la e-GTH. Une réponse similaire est observée avec le testicule du Punnain sous l'influence des hormones LH et FSH de Mammifères (BRENNEMAN et al., 1962). Cette action refléterait le taux de renouvellement de certaines phosphoprotéines et est considérée comme un indice du taux d'activité de l'organe.

c) La e-GTH augmente la teneur en eau du testicule du Cyprin. CLEMENS et GRANT (1964) interprètent cette réaction comme représentant la mobilisation de l'eau nécessaire à l'élaboration du plasma séminal.

L'ensemble de ces données montrent que la glycoprotéine purifiée possède toutes les caractéristiques définissant une hormone. Nous sommes bien en présence d'une hormone gonadotrope hypophysaire de la Carpe.

B. — NOMBRE DES HORMONES

Chez les Poissons Téléostéens comme chez les Mammifères, l'hypophyse est la glande qui sécrète les stimulines indispensables au fonctionnement des diverses glandes endocrines et de la gonade en particulier. De même, les Poissons Téléostéens possèdent des formations tissulaires homologues à celles de la gonade des Mammifères. En conséquence, l'idée que deux hormones gonadotropes de type LH et de type FSH existeraient chez les Poissons Téléostéens a été souvent envisagée (PICKFORD et ATZ, 1957; DOBB, 1960; HOAR, 1966; HYDER, 1970).

Diverses données de la littérature semblent en faveur de cette hypothèse :

a) Deux types de cellules en relation avec la fonction gonadotrope ont été décrits dans l'hypophyse de nombreuses espèces parmi les Vertébrés inférieurs. Ils ont été interprétés comme sécrétant des hormones de types LH et FSH (OLIVEREAU et HERLANT, 1960; OLIVEREAU, 1954; HOAR, 1966).

b) L'hypothèse de l'existence des deux hormones gonadotropes chez les Poissons résulte également des résultats obtenus par l'injection des hormones LH et FSH à des Vertébrés inférieurs. Le fait, par exemple, que la LH, mais non la FSH, soit quelquefois active chez le Poisson a conduit de nombreux auteurs à postuler l'existence d'une hormone de type LH chez le Poisson. Une deuxième hormone de type FSH devenait nécessaire (HOAR, 1966).

En fait, l'existence chez les Mammifères de deux hormones n'a été définitivement retenue qu'à partir du moment où les méthodes de préparation ont permis de séparer les deux hormones. Or, notre travail met en évidence, par l'application des mêmes méthodes biochimiques de fractionnement, l'existence, chez un Poisson Téléostéen, la Carpe, d'une unique hormone capable de stimuler toutes les étapes de la gamétogénèse.

D'autres travaux ont étendu cette hypothèse à un salmonidé. YAMAZAKI et DONALDSON (1968) ont purifié l'hormone gonadotrope d'*Oncorhynchus tshawytscha* et cette hormone stimule de nombreuses activités de la gonade des Vertébrés inférieurs (SUNDARARAJ et al., 1971; LILEY et DONALDSON, 1970; LIGHT et DONALDSON, 1970).

De plus, des études histologiques récentes mettent en cause chez divers Poissons Téléostéens la dualité des cellules sécrétrices des hormones gonadotropes. Il semble en particulier que certaines cellules qui se modifient après gonadectomie ne soient pas gonadotropes mais plutôt productrices de TSH (SCHREIBMAN, 1964 ; VAN OVERBEEKE et MAC BRIDE, 1967 ; MAC BRIDE et VAN OVERBEEKE, 1967). LEATHERLAND (1969) et MATTHEIJ (1970) concluent à l'existence dans l'hypophyse d'un seul type cellulaire en relation avec la stimulation des gonades.

..

Certaines données de la littérature et en particulier le travail de HYDER (1970) chez *Tilapia* suggèrent l'existence, dans certains cas, d'une stimulation différentielle des tissus gamétogénétique et stéroïdène. L'hypothèse d'une seule hormone gonadotrope chez les Poissons Téléostéens peut-elle être conciliée avec ces faits ?

Rappelons d'abord que la gonade des Poissons Téléostéens possède, comme celle des Mammifères d'une part un tissu germinatif qui assure la synthèse des gamètes mâles ou femelles et d'autre part un tissu endocrinien qui sécrète les stéroïdes sexuels. Le tissu gamétogénétique est similaire à celui des Mammifères et a été décrit par de nombreux auteurs, par exemple YAMAZAKI (1965) ; BILLARD (1969) ; LAMBERT (1969). Le tissu stéroïdène de la gonade du Poisson a été étudié chez certaines espèces. LAMBERT et VAN OORDT (1965), BARA (1965) ont montré chez la femelle que les cellules folliculaires sont le siège de la synthèse stéroïdienne. Chez les mâles, le tissu interstitiel est présent (MARSHALL et LOFTS, 1956 ; DELRIO et al., 1967). Les cellules de Sertoli seraient, elles aussi, capables de synthétiser les stéroïdes sexuels (MARSHALL et LOFTS, 1956 ; YARON, 1966 ; O'HALLORAN et IDLER, 1970 ; COLLENOT, 1971).

1. — Si une unique hormone assure effectivement de façon directe la stimulation de toutes les fonctions de la gonade, c'est donc qu'elle peut se lier avec les récepteurs présents dans les divers types de tissus gonadiques. Diverses hypothèses peuvent cependant concilier cette idée avec une stimulation différentielle des divers tissus.

a) Les récepteurs différents peuvent être sensibles à des concentrations d'hormones différentes.

SUNDARARAJ et al. (1972) ont étudié chez le Poisson-chat (*Heteropneustes fossilis*) l'induction de la vitellogénèse, le maintien de la vitellogénèse et l'ovulation après injection de la fraction gonadotrope obtenue après filtration de l'extrait brut d'hypophyses de Carpe sur Sephadex G 100. Ils observent que de fortes doses sont nécessaires pour induire la vitellogénèse mais que des doses très faibles sont suffisantes pour la maintenir lorsque les œufs sont proches de la maturité. L'ovulation se produit après injection d'une forte dose d'hormone. Rappelons à ce propos que BRETON et al. (1972) ont observé dans le plasma du Cyprin une forte décharge d'hormone au moment de l'ovulation. La concentration est alors 5 à 10 fois plus élevée que chez les témoins.

La concentration de l'hormone peut elle-même varier avec des facteurs extérieurs qui exercent un rôle particulièrement important chez les Vertébrés inférieurs. Les conditions de température, de lumière et d'environnement conditionnent pour de nombreuses espèces le moment de l'ovulation et par suite de la ponte (YAMAZAKI, 1965 ; BAGGERMANN, 1969-1972) ont montré que l'ensemble température, durée et intensité de l'éclairage agissait très fortement sur la maturation des gonades et donc sans doute sur la sécrétion de l'hormone gonadotrope elle-même. Les conditions de température et de lumière peuvent intervenir comme un stimulus extérieur sur le système nerveux central et provoquer, par stimulation hypothalamique, une décharge de l'hormone gonadotrope.

b) Les tissus stéroïdène et gamétogénétique pourraient ne pas être toujours stimulables par l'hormone simultanément ; l'un des produits résultant de la stimulation du tissu stéroïdène pourrait contribuer à la stimulation du tissu gamétogénétique en induisant par exemple la synthèse de récepteurs dans l'autre tissu. BRAUN et HETCHER (1970) ont montré que l'ACTH n'était apte à stimuler l'adényl-cyclase de la cellule adipeuse que dans la mesure où des glucocorticoïdes étaient présents.

c) La stimulation d'un des tissus effecteurs de l'hormone pourrait aussi être inhibée. En effet, certains travaux relatifs à d'autres tissus ont mis en évidence des facteurs capables d'inhiber l'activation de l'adényl-cyclase par des hormones (HO et SUTHERLAND, 1971 ; BITENSKY et al., 1971).

2. — Le rôle d'autres hormones dans la stimulation de certains tissus de la gonade ne peut enfin être éliminé. L'accroissement au cours de la maturation sexuelle de l'activité de la thyroïde a été observée par de nombreux auteurs et sur différentes espèces (cf. BARRINGTON et MATTY, 1952 ; OLIVEREAU, 1954 ; ÉTIENNE, 1957). SUNDARARAJ et GOSWAMI (1966-1969) sur *Heteropneustes fossilis* hypophysectomisé induisent l'ovulation aussi bien avec la LH qu'avec les corticostéroïdes. Ils interprètent l'action de la LH par la stimulation de l'interrénal plutôt que par une action directe sur la gonade.

∴

Le nombre des hormones gonadotropes chez les Amphibiens et les Reptiles reste encore indéterminé. Cependant, certaines données de la littérature suggèrent l'existence ici aussi d'une unique hormone. VAN OORDT et de KORT (1969) évoquent la possibilité que les changements cycliques du testicule au cours de l'année peuvent être expliqués sur la base de l'existence d'une seule hormone. Des variations saisonnières de la sensibilité de l'épithélium germinatif et du tissu interstitiel à l'hormone gonadotrope permettraient une stimulation successive de ces deux tissus. Mais aucune conclusion définitive ne peut être apportée avant que des études biochimiques aient pu être entreprises. Le rôle du système nerveux central par le jeu des peptides hypothalamiques n'apparaît pas dans ces études.

Chez le Lézard, LIGHT et PEARSON (1969) suggèrent que des changements cycliques du testicule (*Anolis carolinensis*) peuvent être expliqués par les variations du taux plasmatique d'une unique hormone associées à une plus grande sensibilité du tissu gamétogénétique que du tissu interstitiel. Les hormones LH et FSH chez les Amphibiens ont des effets qualitatifs différents (LOFTS, 1961 ; EYESON, 1971). Ces résultats pourraient être expliqués par l'existence de récepteurs hormonaux différents.

Une étude biochimique récente de PAPKOFF et LIGHT (1972) apporte des éléments nouveaux et intéressants. Ces auteurs ont purifié une hormone gonadotrope à partir d'hypophyses de Tortue. Cette hormone possède certaines caractéristiques biochimiques qui la rapprochent des hormones gonadotropes LH des Mammifères, cependant elle se révèle inactive sur les Mammifères tandis qu'elle agit chez le Lézard (*Anolis carolinensis*) comme le fait la FSH mammalienne.

∴

Chez les Mammifères eux-mêmes, l'existence des deux hormones (LH et FSH) semble permettre d'expliquer facilement la stimulation différentielle des deux tissus gamétogénétique (pour FSH) et stéroïdogène (pour LH). Cependant, l'idée que la FSH puisse agir exclusivement sur le tissu gamétogénétique et la LH sur le tissu stéroïdogène n'est plus retenue. ORTAVANT (1969), par exemple, signale que la manière dont la gonade répond à l'une ou à l'autre hormone n'est pas constante, elle est variable selon l'espèce, l'âge et l'origine zoologique de la préparation hormonale. Nous ne discuterons pas ce problème ici ; citons seulement deux résultats récents obtenus sur des tissus isolés. KUEHL et al. (1970) en étudiant la stimulation de l'adényl-cyclase du testicule du Rat (tubule isolé) ont montré que les deux hormones LH et FSH agissaient sur ce tissu ; ils pensent qu'une relation quantitative existerait entre les activités des deux hormones à stimuler leurs adényl-cyclases réciproques. KOLENA et CHANNING (1972) ont montré que FSH et LH stimulaient l'adényl-cyclase de cellules de la granulosa isolées.

∴

On peut s'interroger sur la signification de l'existence de ces deux hormones et se demander à quel stade de l'évolution elles sont apparues ? HARTREE et CUNNINGHAM (1969) ont séparé chez la Poule deux substances gonadotropes qui, d'après leur action sur le Rat, correspondraient respectivement à une LH et une FSH tandis que chez les Reptiles et les Amphibiens l'hypothèse qu'une seule hormone serait présente, a été émise par LICHT et al. (1970) et par VAN OORDT et de KORT (1969-1972). Ces résultats suggéreraient que l'apparition de l'homéothermie peut avoir été un élément en faveur de l'apparition de la seconde hormone (cf. NICOLL dans discussion BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1972). L'acquisition de cette deuxième hormone est devenue alors nécessaire afin de remplacer la modulation produite par le milieu extérieur et plus particulièrement par la température.

On peut aussi penser qu'une différenciation croissante des récepteurs gamétogénétique et stéroïdienne s'est produite afin d'assurer une régulation de plus en plus fine des gonades. Le cas des Amphibiens et des Reptiles est particulièrement intéressant à considérer de ce point de vue. En effet, ces animaux sont capables de répondre à la fois à l'hormone gonadotrope du Poisson et à la LH comme à la FSH. Cependant, la sensibilité de leur gonade à l'une ou à l'autre hormone est variable selon l'espèce considérée. Ces considérations suggèrent qu'une différenciation des récepteurs des deux formations tissulaires de la gonade s'est produite. On peut alors émettre l'hypothèse qu'une seule protéine soit finalement devenue insuffisante à stimuler efficacement les différents tissus et que la sélection naturelle ait favorisé l'apparition de la seconde hormone gonadotrope hypophysaire.

C. — SPÉCIFICITÉ ZOOLOGIQUE

L'existence d'une spécificité zoologique des hormones gonadotropes a été mise en évidence par de nombreux chercheurs (cf. PICKFORD et ATZ, 1957) et les résultats sont devenus plus nets à partir du moment où les premiers fractionnements d'hypophyses de Mammifères ont permis de séparer des fractions possédant soit l'activité folliculostimulante, soit l'activité lutéinisante.

1. — Entre Poissons Téléostéens

L'ensemble de la bibliographie concernant l'action des extraits hypophysaires de Poissons sur des receveurs Poissons met généralement en évidence l'efficacité de ces extraits à promouvoir la maturation des gonades (cf. PICKFORD et ATZ, 1957). Cependant, CLEMENS et JOHNSON (1964) ont observé que l'amplitude de la réponse du testicule du Cyprin (test d'hydratation) varie avec l'espèce du donneur et que cette variation est d'autant plus importante que l'espèce est plus éloignée du Cyprin receveur. BILLARD et al. (1972) ne peuvent pas restaurer la spermatogénèse du *Pocilia reticulata* hypophysectomisé avec des extraits hypophysaires de Carpe ; BRETON et al. (1972) observent aussi que la régénération de la spermatogénèse du Cyprin hypophysectomisé est d'autant plus satisfaisante que les extraits hypophysaires reçus proviennent d'espèces phylogénétiquement plus proches du Cyprin. BRETON et al. (1972) observe parallèlement l'existence d'une spécificité immunologique des hormones gonadotropes de différentes espèces de Poissons Téléostéens. De plus, Y.-A. FONTAINE et al. (1972) ont étudié l'activité de l'adényl-cyclase d'ovaire de Cyprin sous l'influence des hormones gonadotropes de Carpe et d'*Oncorhynchus* : c-GTH est 36 fois plus active que on-GTH. Cette différence n'apparaît pas être due uniquement à des degrés de pureté différents mais aussi à l'existence d'une spécificité zoologique d'action.

2. — Poissons Téléostéens, Amphibiens et Reptiles

La c-GTH est active sur la gonade des Amphibiens ; elle provoque la spermiation de la Grenouille (*Rana esculenta*) et *Xenopus laevis* (BARR et HOBSON, 1965) et le gonflement du testicule d'*Alytes obstetricans*. Cette dernière réaction peut être rapprochée de celle décrite par SIMON et REINBOTH (1966) qui obtiennent une vésiculisation des testicules de *Xenopus laevis* sous l'influence des hormones gonadotropes LH et FSH comme avec des extraits hypophysaires de Poissons.

En ce qui concerne les Reptiles, LIGHT et DONALDSON (1969) ont montré que la oue-GTH maintenait les testicules d'*Anolis carolinensis* hypophysectomisé dans leur état normal et provoquait la croissance testiculaire et la spermatogénèse chez des animaux en repos sexuel. La e-GTH est capable de stimuler l'activité adényl-cyclasique d'un homogénat d'ovaire de Couleuvre (*Coronella austriaca Laurenti*) (BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1972).

3. — Poissons Téléostéens et Mammifères

a) Lorsque l'on considère l'action des hormones gonadotropes des Mammifères sur les Poissons, l'ensemble des données bibliographiques met en évidence des résultats variables. La FSH apparaît généralement inactive, la LH, par contre, présente une activité biologique sur certaines fonctions de la gonade du Poisson.

α) Chez le mâle. — FONTAINE (1936) induit la maturation de l'Anguille mâle après injection de prolans. ASHAN (1966) observe sur *Couesius plumbeus* hypophysectomisé une action de LH identique à celle d'une préparation partiellement purifiée de l'hypophyse de Saumon. De même, SUNDARARAJ et NAYYAR (1967) et SUNDARARAJ et al. (1971) restaurent la spermatogénèse d'*Heteropneustes fossilis* hypophysectomisé après injection de LH, de HCG ou du propionate de testostérone, mais une préparation gonadotrope de Saumon se révèle 10 fois plus active que la LH. Chez d'autres espèces, YAMAZAKI (1965) et WIEBE (1969) obtiennent également des réponses positives. HYDER et al. (1970) observent une hypertrophie du tissu interstitiel du testicule de *Tilapia* sous l'influence de HCG. Par contre, l'étude de la régénération de la spermatogénèse montre clairement l'inefficacité des hormones gonadotropes (LH, FSH, HCG) sur ce récepteur. Comme nous l'avons vu, l'histologie des gonades des animaux traités met en évidence une importante dégradation de la structure du testicule. Ni la FSH, ni la LH et le HCG ne sont capables de stimuler la fixation du phosphore ³²P sur le testicule de l'Anguille. YAMAZAKI et DONALDSON (1968 a) n'obtiennent pas la spermiation du Cyprin hypophysectomisé après injection de la LH ou de la FSH mais ils l'obtiennent avec le HCG.

β) Chez les femelles. — Les hormones mammaliennes se sont généralement révélées inactives sur la vitellogénèse (cf. PICKFORD et ATZ, 1957) ; la LH et la FSH ne stimulent pas l'activité adényl-cyclasique de l'ovaire de Cyprin en prévitellogénèse.

Chez *Heteropneustes fossilis*, la LH est active *in vivo* sur la maturation et l'ovulation mais inactive *in vitro* (GOSWAMI et SUNDARARAJ, 1971). JALABERT et al. (1972) ont observé sur des ovocytes de *Salmo gairdnerii in vitro* l'inefficacité des hormones o-LH, o-FSH et HCG à provoquer la maturation et l'ovulation.

L'ensemble de ces données met en évidence la complexité du problème. La spécificité des récepteurs de la gonade pourrait être plus ou moins stricte selon l'état physiologique, le sexe et l'espèce. Les réponses positives sont généralement obtenues chez le mâle et le plus souvent lorsque le Poisson n'est pas hypophysectomisé. Une action indirecte pourrait expliquer certains résultats positifs. SUNDARARAJ et GOSWAMI (1966) ont montré que, dans le cas d'*Heteropneustes fossilis*, la LH stimulait les sécrétions de corticostéroïdes par l'interréal : ceux-ci ensuite agissaient sur la gonade en provoquant l'ovulation ou la spermiation. Mais ces corticostéroïdes ne peuvent à eux seuls rendre compte des résultats positifs obtenus sur la spermatogénèse de certains Poissons. Une action directe de la LH ne peut être exclue.

∴

b) L'action des extraits hypophysaires de Poisson sur les Mammifères conduit généralement à des actions faibles ou n'augmentant pas avec la dose (BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE, 1965). La présence dans les extraits hypophysaires de certaines substances agissant sur la propre sécrétion d'hormones gonadotropes de l'animal expérimental pourrait expliquer les réponses observées. L'utilisation de l'hormone de Poisson purifiée permet de supprimer d'éventuelles actions hétéro-

tropes ou pharmacodynamiques. Nous n'avons pas observé d'action de la e-GTH sur les Mammifères : cette hormone se révèle aussi incapable de stimuler l'activité adényl-cyclasique d'un homogénat d'ovaire de Rattes prépnères (Y.-A. FONTAINE et al. 1971).

∴

L'action d'une part, des hormones gonadotropes de Poisson sur les Mammifères, d'autre part, des hormones gonadotropes de Mammifères sur les Poissons est limitée ou nulle. Les gonades des Amphibiens comme celles des Reptiles sont au contraire nettement stimulables par ces diverses hormones. Ce fait, ainsi que les similitudes biochimiques existant entre l'hormone gonadotrope de la Carpe et celle des Mammifères (même nature glycoprotéique, même poids moléculaire et structure quaternaire similaire), suggèrent que toutes ces hormones, malgré les différences qui existent entre elles, sont homologues. Nos résultats et ceux acquis précédemment (Y.-A. FONTAINE, 1969) conduisent donc à l'idée que toutes les hormones glycoprotéiques hypophysaires des différents Vertébrés, qu'elles soient gonadotropes ou thyrotropes, constituent une même famille de protéines homologues.

CONCLUSIONS GENERALES

L'hypophyse des Poissons Téléostéens exerce une action décisive dans la stimulation des gonades. Quand nous avons commencé nos recherches, on ne savait rien sur la nature chimique des hormones responsables. De plus, l'utilisation d'extraits bruts d'hypophyses interdisait toute conclusion quant au nombre des hormones gonadotropes présentes chez les Téléostéens et quant au degré de similitude entre ces deux hormones et les gonadotropines des Mammifères FSH et LH qui avaient été seules purifiées jusque-là.

Nous avons abordé l'étude de ce problème par une analyse biochimique et biologique de l'activité gonadotrope présente dans l'hypophyse d'un Poisson Téléostéen, la Carpe (*Cyprinus carpio*).

1° L'utilisation de diverses techniques de fractionnement (percolation alcoolique, filtration sur gel, chromatographie sur échangeurs d'ions, électrophorèse préparative sur gel acrylamide) a permis la purification d'une glycoprotéine (c-GTH). Au cours de ces manipulations, l'activité gonadotrope est recherchée par le test de spermiation de la Grenouille. L'utilisation d'un récepteur choisi parmi les Amphibiens est intéressante car ces animaux répondent aux hormones gonadotropes des différents Vertébrés. L'activité gonadotrope de la glycoprotéine (c-GTH) est exprimée en terme de LH-NH-S 1; son activité spécifique est de 1,5 U. Certaines de ses constantes physico-chimiques ont été déterminées : la composition globale en acides aminés, en sucres et en sucres aminés, le poids moléculaire (26.000 - 28.000) et le point isoélectrique (5,1).

L'étude de l'homogénéité des préparations obtenues met en évidence la présence dans celles-ci d'une protéine inactive d'encombrement stérique moins élevé que le facteur biologiquement actif. Cette protéine inactive, qui est retrouvée même dans les préparations les plus hautement purifiées, provient en fait d'une dissociation de la molécule active. La structure quaternaire de celle-ci a été étudiée en suivant les variations de l'encombrement moléculaire de la glycoprotéine sous l'action de divers agents dissociants. Des résultats semblables à ceux décrits pour les hormones glycoprotéiques des Mammifères ont été observés. Le caractère instable de la glycoprotéine pourrait résulter de cette structure.

2° Nous avons étudié l'activité gonadotrope de la c-GTH chez les Poissons Téléostéens. La c-GTH est capable, chez le Cyprin mâle hypophysectomisé, de restaurer complètement la spermatogénèse et d'induire la spermiation : chez la femelle hypophysectomisée, elle semble aussi capable de stimuler tous les aspects de la fonction ovarienne et en particulier de restaurer la vitellogénèse. La c-GTH stimule également divers paramètres biochimiques de l'activité gonadique (fixation du phosphore ^{32}P par le testicule de l'Anguille, hydratation du testicule de Cyprin, activité adényl-cyclasique de l'ovaire de Cyprin). Le rapport d'activité $\frac{\text{c-GTH}}{\text{hypophyse de Carpe}}$ n'est pas statistiquement différent, qu'il soit déterminé par un de ces tests ou par l'étude de la spermiation chez la Grenouille.

La c-GTH est donc capable de reproduire à elle seule les effets gonadotropes de l'hypophyse sur la gonade de Poissons Téléostéens. Elle apparaît comme l'unique hormone gonadotrope présente dans l'hypophyse de la Carpe. Ce résultat conduit à l'hypothèse selon laquelle chez les

Poissons Téléostéens il existerait une seule hormone gonadotrope. Cette hypothèse a été renforcée par les données similaires obtenues chez *Oncorhynchus tshawytscha* par d'autres auteurs (YAMAZAKI et DONALDSON, 1968).

3° L'hormone gonadotrope de la Carpe a été comparée aux hormones gonadotropes hypophysaires des Mammifères. Ce sont toutes des glycoprotéines et elles ont un poids moléculaire semblable ; la composition chimique (amino-acides, sucres, sucres aminés) est différente. L'hormone gonadotrope de la Carpe serait composée de deux sous-unités mais les caractéristiques d'association et de dissociation de celles-ci ne sont pas identiques à celles décrites pour les préparations des LH et FSH ovine et bovine. Des différences plus nettes sont observées sur le plan biologique. L'hormone gonadotrope de la Carpe apparaît incapable de produire aucune stimulation sur la gonade d'un Mammifère *in vivo* et *in vitro*. Réciproquement, les hormones gonadotropes des Mammifères sont incapables, dans les conditions de nos expériences, de stimuler la gonade des Poissons. L'hormone gonadotrope de la Carpe est à la fois différente de la LH et de la FSH. Cependant, toutes ces hormones sont capables de produire une action gonadotrope sur les Amphibiens et les Reptiles.

Cette propriété commune associée à une même nature glycoprotéique suggère qu'en dépit de certaines différences, toutes ces hormones sont des protéines homologues.

••

Le résultat de cette étude pose deux questions importantes :

A. — Comment la gonade des Poissons peut-elle être régulée par une seule hormone gonadotrope alors qu'elle est constituée de deux types principaux de tissus qui semblent pouvoir, dans certains cas, être stimulés de façon simultanée ? Nous supposons que les récepteurs de l'hormone gonadotrope présents dans ces deux tissus ont des propriétés et en particulier une sensibilité différentes. Selon la concentration de l'hormone dans le plasma, un seul ou plusieurs types de récepteurs pourraient être mis en jeu. Par ailleurs, d'autres hormones pourraient intervenir, par exemple en modifiant différemment les propriétés de ces récepteurs.

B. — Quand et pourquoi dans l'évolution des Vertébrés deux hormones gonadotropes sont-elles apparues ?

Un certain nombre de données indirectes suggérant qu'une seule hormone gonadotrope existerait chez les Amphibiens et les Reptiles, et, s'il se vérifiait que deux hormones sont au contraire présentes chez les Oiseaux, on serait tenté de relier ce fait à l'apparition de l'homéothermie. Une diminution de l'influence modératrice sur la gonade du milieu extérieur pourrait avoir rendu nécessaire une régulation interne plus fine de l'activité sexuelle.

On peut aussi émettre l'hypothèse que le facteur principal dans l'apparition des deux hormones gonadotropes est la différenciation croissante des deux types de récepteurs présents respectivement dans les tissus gamétogénétique et stéroïdogène ; une seule hormone ne pouvant plus être reconnue de façon satisfaisante par tous les récepteurs, la sélection naturelle aurait favorisé l'apparition de la seconde hormone.

BIBLIOGRAPHIE

- AHSAN, S. N., 1966. — Effects of gonadotropic hormones on male hypophysectomized lake chub *Couesius plumbeus*. Can. J. Zool., **44**, 149-171.
- BACGERMAN, B., 1969. — Influence of photoperiod and temperature on the timing of the breeding season in the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Gen. Comp. Endoc., **13**, abstract 8.
- BARA, G., 1965. — Histochemical localisation of $5 \Delta 3 \beta$ hydroxysteroid deshydrogenase in the ovaries of a teleost fish *Scomber scomber* L. Gen. Comp. Endoc., **5**, 284-296.
- BARR, W. A. et HOBSON, B. M., 1964. — Endocrine control of the sexual cycle in the plaice. *Pleuronectens platessa* L. IV Gonadotropic activity of the pituitary glands. Gen. Comp. Endoc., **4**, 608-613.
- BARRINGTON, E. J. W. et MATTY, A. J., 1952. — Influence of thiourea on reproduction in the minnow. Nature Lond., **170**, 105-106.
- BATES, R. W., GARRISON, M. M. et HOWARD, T. B., 1959. — Extraction thyrotropin from pituitary glands, mouse pituitary tumors and blood plasma by percolation. Endocrinology, **65**, 7-17.
- BERSON, S. A., YALOW, R. S., BAUMAN, A., ROTHSCHILD, M. A. et NEWERLY, K., 1956. — Insulin I^{131} metabolism in human subjects : demonstration of insulin binding globulin in the circulation. J. Clin. Invest. **35**, 170-190.
- BILLARD, R., 1969. — La spermatogénèse de *Poecilia reticulata*, I. — Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogénèse. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., **9**, 251-271.
- BILLARD, R., BURZAWA-GÉRARD, E. et BRETON, B., 1970. — Régénération de la spermatogénèse du Cyprin hypophysectomisé (*Carassius auratus* L.) par un facteur gonadotrope hautement purifié de Carpe. C. R. Acad. Sc. Paris. **271**, 1896-1899.
- BILLARD, R., BRETON, B. et DUBOIS, M., 1971. — Immunocytologie et histochimie des cellules gonadotropes et thyrotropes hypophysaires chez la Carpe (*Cyprinus carpio* L.). C. R. Acad. Sc. Paris, **272**, 981-983.
- BILLARD, R., BRETON, B. et SOLARI, A. — (En préparation.)
- BITENSKI, M. W., GORMAN, R. E., NEUFELD, A. H. et KING, R., 1971. — A specific reversible macromolecular inhibitor of hepatic glucagon responsive adenylyl-cyclase. Endocrinology, **89**, 1242-1249.
- BRAUN, T. et HETCHER, O., 1970. — Glucocorticoid regulation of ACTH sensitivity of adenylyl-cyclase in Rat fat cell membranes. Proc. Nat. Acad. Sc., **66**, 995-1001.
- BRENEMAN, W. R., ZELLER, F. J. et CREEK, R. O., 1962. — Radioactive phosphorus uptake by chick testis as an end-point for gonadotropin assay. Endocrinology, **71**, 790-798.
- BRETON, B., 1968. — Contribution à l'étude de l'isolement et du dosage des gonadotropines de Poisson. Thèse de III^e cycle, Lyon.
- BRETON, B., BILLARD, R. et JALABERT, B., 1973. — Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques Téléostéens. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., **13** (3), 347-362.
- BRETON, B., BILLARD, R., JALABERT, B. et KANN, G., 1972. — Dosage radio-immunologique des gonadotropines plasmatiques chez *Carassius auratus* au cours du nyctémère et pendant l'ovulation. Gen. Comp. Endoc., **18**, 463-468.

- BRETON, B., KANN, G., BURZAWA-GÉRARD, E. et BILLARD, R., 1971. — Dosage radio-immunologique d'une hormone gonadotrope de Carpe (*Cyprinus carpio* L.). C. R. Acad. Sc., **272**, 1515-1517.
- BRUN, A. F., HEMMINGSEN, A. M. et MOLLER-CHRISTENSEN, E., 1949. — Attempts to induce experimentally maturation of the gonads of European eel *Anguilla anguilla* L. Acta Endoc., Copenhagen, **2**, 212-226.
- BURZAWA-GÉRARD, E., 1969. — Quelques propriétés des hormones gonadotropes des Poissons comparées à celles des Mammifères. Colloque inter. C.N.R.S., Paris, 1968, **177**, 351-356.
- BURZAWA-GÉRARD, E., 1971. — Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de Poisson Téléostéen, la Carpe (*Cyprinus carpio*). Biochimie, **53**, 545-552.
- BURZAWA-GÉRARD, E. et FONTAINE, Y.-A., 1965. — Activités biologiques d'un facteur hypophysaire gonadotrope purifié de Poisson Téléostéen. Gen. Comp. Endoc., **5**, 87-95.
- BURZAWA-GÉRARD, E. et FONTAINE, Y.-A., 1966. — Sur le problème de l'unicité ou de la dualité de l'hormone gonadotrope hypophysaire d'un Téléostéen, la Carpe. Etude du poids moléculaire de la ou les substances actives. Ann. Endoc., **27**, suppl. n° 3, 305-309.
- BURZAWA-GÉRARD, E. et FONTAINE, Y.-A., 1972. — The gonadotropins of lower Vertebrates. Gen. Comp. Endoc. Suppl. **3**, 715-728.
- BUTLER, P. A., 1940. — Modification of the normal seasonal cycle by means of pituitary hormones in the common goldfish (*Carassius auratus* L.). Ph. D. Dissertation North Western University.
- BUTT, W. R. et LYNCH, S. S., 1972. — Human pituitary FSH. Dans hormones glycoprotéiques hypophysaires. Colloque I.N.S.E.R.M. Hôpital Saint-Antoine, Paris, 83-92.
- CHAVIN, W., 1956. — Pituitary adrenal control of melanization in xanthic goldfish (*Carassius auratus* L.). J. Exp. Zool., **133**, 1-45.
- CLEMENS, H. P. et GRANT, F. B., 1964. — Gonadal hydration of Carp (*Cyprinus carpio* L.) and Goldfish (*Carassius auratus* L.) after injection of pituitary extracts. Zool. **49**, 193-210.
- CLEMENS, H. P. et JOHNSON, W. W., 1965. — Specificity of the gonadal hydration factor in the pituitary of some freshwater fishes. Copeia, **2**, 389-398.
- COLLENOT, G., 1971. — Structure et activité du testicule de *Scyliorhinus canicula* depuis l'éclosion jusqu'à l'état adulte. Thèse Doct. Sc. Nat. Univ. Paris.
- CONDLIFFE, P. G., BATES, R. W., GARRISON, M. M. et HOWARD, T. B., 1960. — On the existence of multiple forms of bovine thyrotropin. Bioch. Biophys. Acta, **37**, 150-151.
- COURTE, C., 1970. — Isolement, études physico-chimiques et biologiques de l'hormone lutéinisante de trois espèces de Mammifères, le Mouton, le Bœuf et le Rat. Thèse. Paris.
- CREASER, C. W. et GORSMAN, A., 1939. — Species specificity of the gonadotropic factors in Vertebrates. Quart. Rev. Biol., **14**, 311-331.
- CRESSERI, A. et BEVACQUA, R., 1950. — Azione della adrenalina e degli adrenalino. Simila sulla gonada maschile di Rana esculenta L. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **26**, 1503-1505.
- DAVIS, B. J., 1964. — Disq-electrophoresis. II. — Method and application to human serum protein. Annals of the N. Y. Acad. Sc., **121**, 404-427.
- DELSOL, M., 1959. — L'action de l'hormone gonadotrope sur les gonades de Têtards très jeunes d'*Alytes obstetricans*. C. R. Soc. Biol., **153**, 1003-1007.
- DELSOL, M. et FLATIN, J., 1964. — Réactions du Têtard d'*Alytes* aux hormones gonadotropes - test de dosage d'une hormone de type FSH. Ann. Endoc., **25**, 285-305.
- DELSOL, M., BURZAWA-GÉRARD, E., FLATIN, J., FONTAINE, Y.-A. et LERAY, C., 1970. — Nouvelles observations sur le test de dosage des hormones gonadotropes utilisant le Têtard d'*Alytes obstetricans*. Essais réalisés avec des substances purifiées LH et FSH (NIH). Ann. Endoc., **31**, 481-484.
- DELRIO, G., BOTTE, V. et CHIEFFY, G., 1967. — Identification of Leyding cell homologue in the testis of certain teleost fish through histoenzymatic reactions. Enzyme Histochemistry Symp. Antonio baselli, Milano.
- DISCHE, Z. et SHETTLES, L. B., 1948. — A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem., **175**, 595-603.

- DONALDSON, E. M. et YAMAZAKI, F., 1968. — Preparation of gonadotrophic hormone from Salmon pituitary glands. Ann. Conf. Chem. Inst. of Canada, 51st, p. 64 (Abstract).
- DONALDSON, E. M., YAMAZAKI, F., DYE, H. M. et PHILLEO, W. W., 1972. — Preparation of gonadotropin from Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. Gen. Comp. Endoc., 18, 469-481.
- DYKE, Van et WALLEN LAURENCE, 1932. — J. Pharmacol., 27, 163. Cité dans JUTISZ, M., 1960. — Hormone lutéinisante hypophysaire (LH ou ICSH) dans Etudes Endoc., Hermann, Paris, 350 pp.
- EMMENS, C. W., 1948. — Principles of biological assay. Chapman and Hall Ltd., London.
- ETIENNE, N., 1959. — Influence de la maturation sexuelle provoquée sur l'activité thyroïdienne de l'Anguille européenne mâle (*Anguilla anguilla* L.). C. R. Soc. Biol., 153, 41-44.
- EVANS, H. M., KORPI, K., SAMPSON, M. E., PENCHARZ, R. I. et WONDER, D. H. 1936. — On the separation of interstitial cell-stimulating fractions in the anterior pituitary gonadotropic complex. Univ. of California. Pub. in : Anat. 1, 255-273.
- EYESON, K. N., 1971. — The role of the pituitary gland in testicular function in the Lezard *Agama agama*. Gen. Comp. Endoc., 16, 342-353.
- FEVOLD, H. L., HISAW, F. L. et LEONARD, S. L., 1931. — The gonad stimulating and luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. Am. S. Physiol., 97, 291-301.
- FLODIN, P. et KILLANDER, S., 1962. — Fractionation of human serum protein by gel filtration. Bioch. Biophys. Acta, 63, 403-410.
- FONTAINE, M., 1936. — Sur la maturation complète des organes génitaux de l'Anguille mâle et l'émission spontanée de ses produits sexuels. C. R. Acad. Sc., 202, 1312-1314.
- FONTAINE, M., 1939. — La physiologie de la sexualité de l'Anguille. Rapport de l'assemblée plénière de la Com. inter. pour l'exploitation scientifique de la mer Méditerranée, 11 pp.
- FONTAINE, M., BERTRAND, E., LOPEZ, E. et CALLAMAND, O., 1964. — Sur la maturation des organes génitaux de l'Anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des œufs en aquarium. C. R. Acad. Sc., 259, 2907-2910.
- FONTAINE, M., BURZAWA-GÉRARD, E. et FONTAINE, Y.-A., 1966. — Spécificité zoologique des hormones gonadotropes. Intérêt en recherche fondamentale et appliquée. Bull. Acad. Nat. Méde., 150, 45-49.
- FONTAINE, M. et CHAUVEL, M., 1961. — Evaluation du pouvoir gonadotrope de l'hypophyse des Poissons Téléostéens, et en particulier du *Salmo salar* L. à diverses étapes de son développement et de ses migrations. C. R. Acad. Sc., 252, 822-824.
- FONTAINE, M. et FONTAINE, Y.-A., 1956. — Détermination du pouvoir thyrotrope de l'hypophyse et du milieu intérieur de Téléostéens par la mesure de la fixation de ¹³¹I par la thyroïde de la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* Rich.). J. Physiol., Paris, 48, 881-892.
- FONTAINE, Y.-A., 1955. — Contribution à l'étude du dosage de l'hormone thyrotrope dans l'hypophyse de divers Vertébrés au moyen de l'iode radio-actif. Arch. Sc. Physiol., 9, 183-207.
- FONTAINE, Y.-A., 1969. — La spécificité zoologique des protéines hypophysaires capables de stimuler la thyroïde. Acta Endoc., 60, suppl. 136, 1-154.
- FONTAINE, Y.-A., BURZAWA-GÉRARD, E. et DELERUE-LEBELE, N., 1970. — Stimulation hormonale de l'activité adényl-cyclasique de l'ovaire d'un Poisson Téléostéen, le Cyprin (*Carassius auratus* L.). C. R. Acad. Sc., 271, 780-783.
- FONTAINE, Y.-A. et CONDLIFFE, P. G., 1964. — Density gradient centrifugation of bovine thyroid stimulating hormone. Biochemistry, 2, 250-253.
- FONTAINE, Y.-A., FONTAINE-BERTRAND, E., SALMON, C. et DELERUE-LEBELE, N., 1971. — Stimulation *in vitro* par deux hormones gonadotropes hypophysaires (LH et FSH) de l'activité adényl-cyclasique de l'ovaire chez la Ratte prépubère. C. R. Acad. Sc., Paris, 272, 1137-1140.
- FONTAINE, Y.-A. et GÉRARD, E., 1963. — Purification d'un facteur gonadotrope de l'hypophyse d'un Téléostéen, la Carpe (*Cyprinus carpio* L.). C. R. Acad. Sc., 256, 5634-5637.
- FONTAINE, Y.-A., SALMON, C., FONTAINE-BERTRAND, E., BURZAWA-GÉRARD, E. et DONALDSON, E. M., 1972. — Comparison of the activities of two purified fish gonadotropins on adényl-cyclase. Can. J. Zool., 50, 1673-1676.

- GRABAR, P., 1960. — Méthode d'analyse immuno-électrophorétique dans GRABAR et BURTIN's. Analyse électrophorétique. Application aux liquides biologiques humains, Masson, Ed., Paris.
- GOSWAMI, S. V. et SUNDARARAJ, B. I., 1971. — *In vitro* maturation and ovulation of the Catfish. *Heteropneustes fossilis* (Bloch) : Effects of Mammalian hypophyseal hormones, Catfish pituitary homogenate steroid precursors and metabolites and gonadal and adrenocortical steroids. J. Exp. Zool., **178**, 467-478.
- HARTREE, A. S. et CUNNINGHAM, F. J., 1969. — Purification of chicken pituitary follicle stimulating and luteinizing hormone. J. Endoc., **43**, 609-617.
- HASLER, A. D. et MEYER, R. K., 1942. — Respiratory responses of normal and castrated goldfish to teleost and Mammalian hormones. J. Exp. Zool., **91**, 391-404.
- HERMIER, C., 1965. — Purification et propriétés chimiques et biologiques de l'hormone hypophysaire folliculo-stimulante, Thèse, Paris.
- HO, R. J. et SUTHERLAND, E. W., 1971. — Formation and release of a hormone antagonist by Rat adipocytes. J. Biol. Chem., **246**, 6822-6827.
- HOAR, W. S., 1966. — Hormonal activities of the pars distalis in cyclostomes fish and amphibia. Dans : « The pituitary gland », G. W. HARRIS and B. T. DONOVAN, Ed. Butterworths, 242-294.
- HOAR, W. S., 1969. — Reproduction dans « Fish physiology », édité par HOAR et RANDALL, volume 3, 1-72, Academic Press, New York et Londres.
- HOUSSAY, B. A., GIUSTI, E. et LASCANO-GONZALEZ, S. M., 1929. — Implantation et stimulation des glandes et des fonctions sexuelles du Crapaud. C. R. Soc. Biol., Paris, **102**, 864-866.
- HYDER, M., 1970. — Histological studies on the testis of pond specimens of *Tilapia nigra* (Günther Pisces cichlidae) and their implications on the pituitary testis relationship. Gen. Comp. Endoc., **14**, 198-211.
- HYDER, M., SHAH, A. V. et KIRSCHNER, M. A., 1970. — Effect of chorionic gonadotropin on testicular histology and testosterone production in *Tilapia leucosticta*. Endoc., **87**, 819-822.
- JALABERT, B., BRETON, B. et BRY, C., 1972. — Maturation et ovulation *in vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*). C. R. Acad. Sc., **275**, 1139-1142.
- JOVIN, T., CHAMBACH, A. et NAUGHTON, N., 1964. — An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Bioch., **9**, 351-369.
- JUTSZ, M. et SQUIRE, P. C., 1958. — Occurrence of several active components in sheep pituitary interstitial cell stimulating hormone as evidenced by column electrophoresis. Bull. Soc. Chem. Biol., **40**, 1875-1883.
- KAZANSKII, B. N., 1951. — Experimental analysis of the growth of ovocytes in fish. Dkl. Akad. Nauk. U.R.S.S., **80**, 277-280.
- KILHSTROM, J. E. et DANNINGE, I., 1970. — Release of sperms cells in the frog *Rana esculenta* L. induced by a pituitary extract probably without gonadotropic activity. Gen. Comp. Endoc., **14**, 592-593.
- KILHSTROM, J. E., LAKOMA, E. et HALL, H., 1971. — A probably non-gonadotropic sperm-releasing activity in the pituitary gland from Mammals Amphibians and Fishes. Gen. Comp. Endoc., **17**, 573-575.
- KOLENA, J. et CHANNING, C. P., 1971. — Stimulatory effects of gonadotropins on the formation of cyclic 3'5' monophosphate adenosine by porcine granulosa cells. Biochem. Biophys. Acta, **251**, 601.
- KRISHNA, G., WEISS, B. et BRODIE, B. B., 1968. — A simple sensitive method for the assay of adenylyl-cyclase. J. Pharm. Exp. Therap. **163**, 379-385.
- KUEHL, F. A. Jr., PATANELLI, D. T., TARNOFF, S. et HUMES, S.L., 1970. — Testicular adenylyl-cyclase : Stimulation by the pituitary gonadotropins. Biol. of Reproduction, **2**, 154-163.
- LAMBERT, J. G. D. et OORDT, P. G. W. J. Van. 1965. — Preovulatory corpora lutea or corpora atretica in the guppy *Poecilia reticulata*. A histological and histochemical study. Gen. Comp. Endoc., **5**, 693-694.
- LAMBERT, J. G. D. et OORDT, P. G. W. J. Van. 1969. — The production of steroids in the ovary of *Poecilia reticulata*. Gen. Comp. Endoc., **13**, 86.

- LAMBERT, J. G. D., 1969. — Steroid productie in het ovarium van *Poecilia reticulata*. Thèse, 1-97. Utrecht.
- LLOSA, P. de la, COURTE, C. et JUTISZ, M., 1967. — On the mechanism of reversible inactivation of luteinizing hormone by urea. *Bioch. Biophys. Res. Com.*, **26**, 411-415.
- LLOSA, P. de la et JUTISZ, M., 1968. — Protein et polypeptide hormones. Ed. par M. MARGOULIES. *Excerpta Med. Inter. Congress Ser.*, **161**, part 1, 229.
- LLOSA, P. de la et JUTISZ, M., 1969. Reversible dissociation into subunits and biological activity of ovine luteinizing hormone. *Bioch. Biophys. Acta*, **181**, 426-436.
- LEATHERLAND, J. F., 1969. — Studies on the structure and ultrastructure of the intact and « methalibure » treated mesoadenohypophysis of the viviparous Teleost cymagaster aggregate Gibbons. *Z. Zellforsch.*, **98**, 122-134.
- LERAY, C., 1963. — Evaluation du pouvoir gonadotrope (type FSH) dans l'hypophyse des Téléostéens et plus spécialement de *Cyprinus carpio* L. *C. R. Acad. Sc.*, **256**, 4744-4747.
- LEWIS, U. J., CHEEVER, E. U. et SFAVEY, B. K., 1968. — Influence of fatty acids on the electrophoretic behavior of proteins with special reference to pituitary hormones and thyroglobulin. *J. Biol. Chem.*, **243**, 260-267.
- LIAO, T. H. et PIERCE, J. G., 1970. — The presence of a common type of subunit in bovine thyroid-stimulating and luteinizing hormones. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3375-3381.
- LICHT, P., 1970. — Effects of mammalian gonadotropins (ovine FSH and LH) in female Lizards. *Gen. Comp. Endoc.*, **14**, 98-106.
- LICHT, P. et DONALDSON, E. M., 1969. — Gonadotropic activity of Salmon pituitary extract in the male Lizard (*Anolis carolinensis*). *Biol. of Reproduction*, **1**, 307-314.
- LICHT, P. et PEARSON, A. K., 1969. — Effects of mammalian gonadotropins (FSH and LH) on the testis of the Lizard (*Anolis carolinensis*). *Gen. Comp. Endoc.*, **13**, 367-381.
- LILEY, N. R. et DONALDSON, E. M., 1969. — The effects of Salmon pituitary gonadotropin on the ovary and sexual behavior of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Can. J. Zool.*, **47**, 569-573.
- LOFTS, D., 1961. — The effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on the testis of hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*). *Gen. Comp. Endoc.*, **1**, 179-189.
- LOFTS, B., 1964. — Seasonal changes in the functional activity of the interstitial and spermatogenic tissues of the green frog (*Rana esculenta*). *Gen. Comp. Endoc.*, **4**, 550-562.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. S., FARR, A. L. et RANDALL, R. S., 1951. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAC BRIDE, S. R. et OVERBEEK, A. P. Van, 1969. — Cytological changes in the pituitary gland of the adult Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) after gonadectomy. *J. Fish. Res. Bd Canada*, **26**, 1147-1156.
- MARSHALL, A. J. et LOETS, B., 1956. — The Leydig-cell homologue in certain teleost fishes. *Nature, London*, **177**, 704-705.
- MARTIN, R. G. et AMES, B. N., 1961. — A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1372-1379.
- MATTHELI, J. A. M., 1970. — The gonadotropic cells in the adenohypophysis of the blind mexican cave fish *Anoptichtys jordani*. *Z. Zellforsch.*, **105**, 91-106.
- MIDLEY, A. R. Jr., NISWENDER, G. D. et REBAR, R. W., 1969. — Principles for the assessment of reliability of radio-immunoassay method (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta Endoc.*, **63**, suppl. **142**, 163-184.
- MOORE, S., SPACKMAN, D. H. et STEIN, W. H., 1958. — Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal. Chem.*, **30**, 1185-1190.
- NEHAUS, O. W. et LETZRING, M., 1957. — Determination of hexosamines in conjunction with electrophoresis on starch. *Anal. Chem.*, **29**, 1230-1233.
- NICOLL, C. S. — Cf. discussion E. BURZAWA-GÉRARD et Y.-A. FONTAINE (1972).
- O'HALLORAN, M. S. et IDLER, D. R., 1970. — Identification and distribution of the Leydig - cell homologue in the testis of sexually mature atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endoc.*, **15**, 361-364.

- OLIVEREAU, M., 1954. — Hypophyse et glande thyroïde chez les Poissons. Etude histophysiologique de quelques corrélations endocriniennes, en particulier chez *Salmo salar*. L. Ann. Inst. Océanogr., Monaco.
- OLIVEREAU, M. et HERLAND, M., 1960. — Etude de l'hypophyse de l'Anguille mâle au cours de la reproduction. C. R. Soc. Biol., **154**, 706-709.
- OORDT, P. C. W. J. Van et KORT, E. J. M. de, 1969. — Functions of gonadotropins in adult male Amphibia. Coll. Inter. C.N.R.S. n° 177, 345-350.
- ORNSTEIN, L., 1964. — Disc electrophoresis. I. — Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sc., **121**, 321-349.
- OTSUKA, S., 1956. — On the extraction and bioassay of the follicle stimulating and luteinizing substances of the Salmon. Endoc., Japon, **3**, 272-277.
- ORTAVANT, R., COUROT, M. et REVIERS, M.-M. de, 1969. — Activités spécifiques des différentes FSH et LH sur le testicule des Mammifères. Coll. Inter. C.N.R.S., n° 177, 369-379.
- OVERBREEKE, A. P. Van et MAC BRIDE, J. R., 1967. — The pituitary gland of the Sockeye (*Oncorhynchus nerka*) during sexual maturation and spawning. J. Fish. Res. Bd Can., **24**, 1791-1810.
- PAPKOFF, H., 1971. — The subunit nature of interstitial cell-stimulating hormone and follicle-stimulating hormone. Inter. Congress, serie n° 241, Excerpta Med., 73-79.
- PAPKOFF, H. et EKBLAD, M., 1970. — Ovine follicle stimulating hormone preparation and characterization of its subunits. Bioch. Biophys. Res. Com., **40**, 614-620.
- PAPKOFF, H. et LIGHT, P., 1972. — On the purification of reptilian (Turtle) pituitary gonadotropin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. U.S.A., **139**, 372-376.
- PAPKOFF, H. et SAMY, T. S., 1967. — Isolation and partial characterization of the polypeptide chains of ovine cell-stimulating hormone. Bioch. Biophys. Acta, **147**, 175-177.
- PARLOW, A. F., 1961. — Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion of ovarian ascorbic acid dans « Human pituitary gonadotropins », Albert, Ed., 300-310, Ch. THOMAS.
- PARLOW, A. F., CONDLIFFE, P. C., REICHERT, L. E. et WILHELM, A. E., 1965. — Recovery and partial purification of the human TSH. Endoc. **76**, 27-34.
- PELLETIER, J., 1963. — Etude critique du dosage de ICSH par la méthode de l'acide ascorbique ovarien. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., **3**, 307-323.
- PICKFORD, G. E. et ATZ, J. W., 1957. — The physiology of the pituitary gland of fishes. N. Y. Zool. Soc., 613 pp.
- PIERCE, J. G., LIAD, T. H., HOWARD, S. M., SHOME, B. et CORNELL, J. S., 1970. — Studies on the structure of thyrotropin its relationship to luteinizing hormone. Rec. progr. in horm. Res., **27**, 165-212.
- PIERCE, J. G., 1971. — Eli Lilly lecture. The subunits of pituitary thyrotropin. Their relationship to other glycoprotein hormones. Endoc., **89**, 1331-1344.
- PIERCE, J. G., WYNSTON, L. K. et LARSTEIN, M. E., 1958. — Studies on the purification of thyrotropin. Bioch. Biophys. Acta, **43**, 538-540.
- REICHERT, L. E. Jr., RASCO, M. A., WARD, D. N., NISWENDER, G. D. et MIDGLEY, A. R. Jr., 1969. — Isolation and properties of subunits of bovine pituitary luteinizing hormone. J. Biol. Chem., **244**, 5110-5117.
- SCHREIBMAN, M. P., 1964. — Studies on the pituitary gland of *Xiphophorus maculatus* (the platy fish). Zool., **49**, 217-243.
- SINHA, V. R. P., 1969. — Chromatography of fish pituitary extracts on Sephadex G 100. J. Chromat., **44**, 624-628.
- SINHA, V. R. P., 1971. — On induced spawning in the Carp with fractionated fish pituitary extract. J. Fish. Biol., **3**, 263-272.
- SIMON, N. et REINBOTH, R., 1966. — Juvenile Anuren als testobjekte für gonadotrope hormone. Verh. Deuts. Zool. Gesell., Suppl. **30**, 254-264.
- SOBER, H. A., GUTLER, F. J., WYCKOFF, M. M. et PETERSON, E. A., 1956. — Chromatography of proteins. II. — Fractionation of serum proteins on anion exchange cellulose. J. Amer. Chem. Soc., **78**, 756-763.

- STELMAN, S. L. et POHLEY, F. M., 1953. — Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endoc.*, **53**, 604-616.
- SUNDARARAJ, B. I., ANAND, T. C. et SINHA, V. R. P., 1972. — Effects of Carp pituitary Sephadex G 100 fractions on vitellogenesis ovarian maintenance and ovulation in the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Endoc.*, **54**, 87-98.
- SUNDARARAJ, B. I. et GOSWAMI, S. V., 1966 a. — Effects of Mammalian hypophysial hormones, placental gonadotropins, gonadal hormones and adrenal corticosteroids on ovulation and spawning in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Exp. Zool.*, **161**, 287-296.
- SUNDARARAJ, B. I. et GOSWAMI, S. V., 1966 b. — Effects of Metopiron (SU-4885) on luteinizing hormone and corticosteroid-induced ovulation and spawning in hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Exp. Zool.*, **163**, 49-54.
- SUNDARARAJ, B. I. et GOSWAMI, S. V., 1969. — Role of interrenal in luteinizing hormone induced ovulation and spawning in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endoc.*, suppl. 2, 374-384.
- SUNDARARAJ, B. I. et NAYYAR, S. K., 1967. — Effects of exogenous gonadotropins and gonadal hormones on the testes and seminal vesicles of hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endoc.*, **8**, 403-416.
- SUNDARARAJ, B. I., NAYYAR, S. K., ANAND, T. C. et DONALDSON, E. M., 1971. — Effects of Salmon pituitary gonadotropin, ovine luteinizing hormone and testosterone on the testes and seminal vesicles of hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endoc.*, **17**, 73-82.
- SUTHERLAND, E. W., ROBISON, G. A. et BUTCHER, R. W., 1968. — Some aspects of the biological role of adenosine 3'5' monophosphate (cyclic AMP). *Circulation*, **37**, 279-306.
- TSUCITA, A. et AKABORI, S., 1959. — The structure of glycopeptides obtained from taka-amylase. *A. J. Bioch.*, Japon, **46**, 695-704.
- UTIGER, R. D., ODELL, W. D. et CONDLIFFE, P. G., 1963. — Immunological studies of purified and bovine thyrotropins. *Endoc.*, **73**, 359-365.
- VIVIEN, S. H., 1939. — Rôle de l'hypophyse dans le déterminisme du cycle sexuel chez les Poissons. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **64**, 141.
- VIVIEN, S. H., 1941. — Contribution à l'étude de la physiologie hypophysaire dans ses relations avec l'appareil génital, la thyroïde et les corps suprarénaux chez les Poissons Sélaciens et Téléostéens. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **75**, 237-309.
- VIVIEN, S. H., 1952. — Rôle de l'hypophyse dans le déterminisme de l'involution ovarienne et l'inversion sexuelle chez les Xiphophores. *J. Physiol.*, Paris, **44**, 349-351.
- WIEBE, J. P., 1969. — Endocrine controls of spermatogenesis and oogenesis in the viviparous seaperch *Cymagaster aggregata* Gibbons. *Gen. Comp. Endoc.*, **12**, 267-275.
- YAMAZAKI, F., 1965. — Endocrinological studies on the reproduction of the female goldfish (*Carassius auratus L.*) with special reference to the function of the pituitary gland. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, **13**, 1-64.
- YAMAZAKI, F. et DONALDSON, E. M., 1968 a. — The spermiation of goldfish (*Carassius auratus L.*) as a bioassay for Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotropin. *Gen. Comp. Endoc.*, **10**, 383-391.
- YAMAZAKI, F. et DONALDSON, E. M., 1968 b. — The effect of partially purified Salmon pituitary gonadotropin on spermatogenesis, vitellogenesis and ovulation in hypophysectomized goldfish. *Gen. Comp. Endoc.*, **11**, 292-299.
- YAMAZAKI, F. et DONALDSON, E. M., 1969. — Involvement of gonadotropin and steroid hormones in the spermiation of the goldfish (*Carassius auratus L.*). *Gen. Comp. Endoc.*, **12**, 491-947.
- YARON, Z., 1966. — Demonstration of 3 β hydroxysteroidshydrogenase in the testis of *Tilapia mossambica* (Cichlidae teleostei). *J. Endoc.*, **34**, 127-128.

